

ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

На правах рукопису

ГОРДІЄНКО ОЛЬГА ІВАНІВНА

УДК: 577.352.4:576.324:612.111

МЕХАНІЗМИ ПАСИВНОЇ ПРОНИКНОСТІ ДО НЕЕЛЕКТРОЛІТІВ ТА
ІНДЕКС СФЕРИЧНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

03.00.02-біофізика

Дисертація
на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук

Харків – 2004

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ І ПОЗНАЧЕНЬ.....	5
ВСТУП.....	6
РОЗДІЛ 1. СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ПАСИВНУ ПРОНИКНІСТЬ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН ТА ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ ФОРМИ ЕРИТРОЦИТІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)	
1.1. Методи визначення проникності біологічних мембран.....	18
1.2. Проникність ліпідних бішарів та біологічних мембран.....	32
1.3. Вплив температури на характеристики проникності біологічних мембран	60
1.4. Геометричні параметри еритроцитів.....	72
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	
2.1. Матеріали	80
2.2. Методи дослідження.....	81
2.2.1. Теоретичні методи.....	81
2.2.2. Теоретичні основи використання методу малокутового розсіювання світла.....	81
2.2.3. Прилад для вимірювання малокутового розсіювання світла клітинною суспензією.....	87
2.2.4. Експериментальне визначення малокутового розсіювання світла клітинною суспензією.....	89
2.2.5. Експериментальне визначення коефіцієнтів проникності еритроцитів для електронейтральних речовин.....	90
2.2.6. Експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності.....	92
РОЗДІЛ 3. ТЕОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОЦЕСІВ ПАСИВНОГО ТРАНСМЕМБРАННОГО МАСОПЕРЕНОСУ	
3.1 Джерело ентропії і рівняння руху багатокомпонентного розчину..	95
3.2. Фізична інтерпретація коефіцієнтів пасивного	

масопереносу як коефіцієнтів тертя.....	107
3.3. Висновки.....	119
РОЗДІЛ 4. ФІЗИКО-МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ ГІПОТОНІЧНОГО ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ	
4.1. Кінетика зміни об'єму еритроцита у водному розчині проникаючої речовини.....	120
4.2. Фізико-математична модель флуктуаційного утворення пори в ізотропно розтягнутій мембрані еритроцита.....	126
4.3. Висновки.....	143
РОЗДІЛ 5. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КОЕФІЦІЄНТІВ ПРОНИКНОСТІ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ.....	
5.1. Визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів до речовин низки діолів.....	146
5.2. Визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів до речовин низки амідів.....	157
5.3. Фізико-математична модель дифузії малих електронеутральных молекул крізь білкові мембранні пори.....	163
5.4. Проникність мембран еритроцитів людини для гліцерину та його ефірних похідних.....	170
5.5. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів людини до 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду.....	177
5.6. Висновки.....	190
РОЗДІЛ 6. РОЗПОДІЛ ЕРИТРОЦИТІВ У ПОПУЛЯЦІЇ ЗА ІНДЕКСОМ СФЕРИЧНОСТІ.....	
6.1. Теоретичне обґрунтування методу визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності.....	192
6.2. Експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності.....	202
6.3. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності	

в популяціях еритроцитів хворих на гіпо- та гіпертиреоз.....	214
6.4. Вплив температури на розподіл еритроцитів за індексом сферичності.....	225
6.5. Висновки.....	237
ПІДСУМОК.....	240
ВИСНОВКИ.....	251
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	254

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

pCMBS	p-chloromercuribenzenesulfonate
BLM	чорні ліпідні мембрани (штучні)
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
DIDS	4,4'-diisothiocyanate-2,2'-stilbene disulfonate
CHIP28	channel-forming integral membrane protein MM 28 kDa (канал-формуючий інтегральний білок мембрани з молекулярною масою 28 кДа)
MIP	major intrinsic protein (великий інтегральний білок)
AQP	aquaporine (білок, що утворює пори для молекул води)
DMCO	диметилсульфоксид
1,2-ПД	1,2-пропандіол
1-MMEГ	1-монометиловий ефір гліцерину
1-MEEГ	1-моноетиловий ефір гліцерину
1-MIПЕГ	1-моноізопропіловий ефір гліцерину
ГК	гіпертонічний кріогемоліз
P_f	осмотична проникність клітинної мембрани для води
P_d	дифузійна проникність клітинної мембрани для води
f_{sm}	коефіцієнт тертя між розчиненою речовиною і мембраною
f_{sw}	коефіцієнт тертя між розчиненою речовиною і водою
f_{wm}	коефіцієнт тертя між водою і мембраною
L_p	коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани
ω_s	коефіцієнт проникності клітинної мембрани для s-ої речовини
σ_s	коефіцієнт відбиття клітинної мембрани для s-ої речовини
π_s^{in}, π_s^{out}	осмотичний тиск s-ої речовини у внутрішньо- та позаклітинному середовищах
K_p	коефіцієнт розподілу речовини між гідрофобною та гідрофільною фазами

ВСТУП

Актуальність теми

Проникність плазматичних мембран є важливим параметром, що визначає можливість життєдіяльності клітин. Проникання метаболітів крізь мембрану забезпечується, зазвичай, спеціальними системами активного транспорту. Пасивна ж проникність клітинної мембрани визначається її загальною структурою - властивостями окремих компонентів, що входять до її складу, а також системою взаємодій між ними. Таким чином, вивчення проникності мембран до різних речовин надає додаткову інформацію щодо її будови та властивостей в тих чи інших умовах. Уявлення про механізми проникності біологічних мембран розвивались разом з уявленнями про їх структурну організацію і взаємодоповнювали одні одних.

Великий клас незаряджених молекул (неелектролітів) в багатьох випадках проникають крізь біологічні мембрани шляхом пасивної дифузії, зокрема, якщо вони не являються метаболітами. До таких речовин, як правило, відносяться кріопротектори. Однією з перших класифікацій кріопротекторів був їх розподіл на ендо- та екзоцелюлярні [1], тобто фактично на проникаючі та непроникаючі речовини. Кріопротекторну активність також пов'язують в першу чергу із здатністю проникати в клітини і тканини. Хоча наразі синтезовано багато високомолекулярних, не проникаючих крізь клітинні мембрани сполук, які виявляють кріопротекторні властивості, питання проникності тих чи інших кріопротекторів крізь клітинні мембрани залишається актуальним. Не менш актуальним і важливим є питання механізмів проникності кріопротекторної сполуки, оскільки це може бути безпосередньо пов'язаним з її цитотоксичністю.

Термодинамічний підхід до описання та визначення однієї з головних властивостей мембран, її проникності, розвивався незалежно від конкретних уявлень про структуру мембран. Ключовою роботою в цьому напрямку стала робота Kedem, Katchalsky [2]. Виходячи з фундаментальних принципів

термодинаміки необоротних процесів в лінійному наближенні, автори отримали узагальнені рівняння, які були зручними для подальшого їх використання в аналізі даних щодо проникності біологічних мембран. З цього часу всі дослідники, що звертались до проблеми вимірювання коефіцієнтів проникності, так чи інакше використовували результати цієї роботи [3-7]. Однак, слід зазначити, що при цьому не завжди враховувались ті граничні умови та спрощення, які були використані для отримання даних термодинамічних рівнянь.

Кількісне визначення коефіцієнтів проникності біологічних мембран до різних речовин потребує адекватних методів. В роботі [8] описуються три основні експериментальні підходи до визначення коефіцієнтів проникності: (1) визначення зміни клітинного об'єму; (2) вимірювання кількості проникаючої речовини в клітинах хімічним або ізотопним методом; (3) вимірювання часу, необхідного для гемолізу в гіпотонічному за непроникаючою речовиною середовищі.

В першому методі експериментально визначають зміну об'єму клітин при їх вміщенні в розчин проникаючої речовини. Для клітин, що їх мають дослідники у великих кількостях (наприклад, еритроцити), часто застосовують метод розсіювання світла суспензією клітин. Дослідження у випадку еритроцитів ускладнюються у зв'язку з високим значенням проникності еритроцитів для води. Solomon із співавторами застосував так звану систему "зупиненого потоку" і впродовж багатьох років успішно використовував її для вивчення параметрів проникності еритроцитів [3,6,7]. Розроблені цією групою вчених методи потребують застосування складної апаратури та апроксимації експериментальних кривих різними функціями, оскільки аналітичного рішення рівнянь Kedem, Katchalsky для випадків, що їх використовують автори, отримати не вдається. Сумніви в справедливості такої екстраполяції були висловлені в роботі [9]. В роботі [10] ці результати також були піддані критиці. Автори показали, що результати аналізу

залежать від виду апроксимуючої зміну об'єму функції, а також від довжини інтервалу, що використовується для апроксимації.

Вимірювання коефіцієнтів проникності другим методом, тобто за допомогою радіоактивно мічених речовин, є доволі складним. Один з варіантів такого методу описаний в роботі [11]. Проникність мембран визначається шляхом розділення дифузії крізь інтактні плазматичні мембрани спактованих клітин та інших компонентів. Дифузію крізь ці компоненти визначають окремо для позаклітинного (D_1) і внутрішньоклітинного середовища (D_2). Чисельні величини проникності отримують з експериментально визначених D , D_1 і D_2 (D - загальний коефіцієнт дифузії). Описаний метод надає можливість вимірювати дифузійні коефіцієнти проникності. Але, він є дуже трудомістким, а розрахунок коефіцієнтів передбачає ряд наближень та спрощень, що може привести до систематичних помилок у їх визначенні.

При визначенні коефіцієнтів проникності третім способом [8] визначається час 50%-го гемолізу у водному розчині проникаючої речовини, для якої визначається проникність. Коефіцієнти проникності визначають порівнянням експериментальних кривих гемолізу з теоретичним ходом зміни об'єму еритроцита у часі за рівняннями Kedem, Katchalsky при різних значеннях коефіцієнта проникності. Значення коефіцієнта проникності, при якому розрахований час досягнення клітинами критичного об'єму збігається з експериментально визначеним часом 50%-го гемолізу, вважається шуканою величиною. Основним недоліком цього методу є те, що він спирається на припущення, що гемоліз відбувається одразу ж, як тільки клітина досягає певного критичного розміру, або об'єму. Було показано [12], що час гемолізу може значно перевищувати час набрякання еритроцитів до максимального об'єму. Це пов'язано з тим, що гемоліз відбувається внаслідок флуктуаційного утворення макроскопічної пори і має імовірнісну природу [13]. Крім того, у світлі уявлень, висунутих в роботах [13-15], припущення, що викид гемоглобіну з клітин назовні відбувається практично миттєво, є

сумнівним. Навпаки, час, впродовж якого гемоглобін покидає еритроцити при гіпотонічному гемолізі, може бути такого ж порядку, як і час утворення макроскопічної пори в мембрані, або навіть перевищувати його.

Очевидно, що використання методу 50%-го гемолізу потребує вдосконалення фізико-математичної моделі процесу для адекватного визначення коефіцієнтів проникності. Ця модель повинна враховувати процес флуктуаційного утворення пори (або пор) в мембрані еритроцита і його внесок в загальний час гемолізу. Згідно з гіпотезою, запропонованою В.С.Маркіним зі співавт. [13] і нами [14], а також у світлі нових експериментальних даних, існуючі уявлення щодо процесу гіпотонічного гемолізу не відповідають дійсності. Таким чином, виникає проблема перегляду та удосконалення попередніх уявлень про причину, механізм та закономірності процесу гіпотонічного гемолізу та створення адекватної біофізичної теорії цього явища. Зокрема, маємо необхідність модифікувати метод вимірювання коефіцієнтів проникності еритроцитів до електрично нейтральних речовин.

Створення правильної фізико-математичної теорії гіпотонічного гемолізу зараз можливо з двох міркувань. Перш за все, геометричні та морфологічні характеристики еритроцитів людини, які необхідні для створення кількісної теорії цього явища, експериментально визначені. По-друге, розвинена термодинамічна теорія флуктуаційного утворення макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані. Це дозволяє описати явище, виходячи з фундаментальних принципів термодинаміки необоротних процесів, теорії пружності тонких оболонок при кінцевих деформаціях, теорії випадкових процесів і гідродинаміки. За такою теорією можливо розрахувати вміст внутрішньоклітинного гемоглобіну й об'єм еритроцита упродовж гіпотонічного гемолізу в залежності від значення коефіцієнта проникності мембран для певної речовини. На протязі більшого часу гіпотонічного гемолізу еритроцити можуть розглядатись як гомогенні сфери. Цей факт дозволяє розрахувати інтенсивність розсіяного клітинами світла при гемолізі,

спираючись на теорію Мі (теорія розсіяння світла сферичними частинками) в наближенні аномальної дифракції. Інтенсивність розсіяного світла в цьому випадку залежить від об'єму клітини та її коефіцієнта заломлення. З іншого боку, інтенсивність розсіяного еритроцитами світла упродовж їх гіпотонічного гемолізу може бути визначена експериментально. Таким чином, існують передумови для розробки простого і точного методу вимірювання коефіцієнтів проникності. Розробка відносно простого, але достатньо точного методу вимірювання коефіцієнтів проникності надасть нові можливості для широкого вивчення механізмів проникності та структурно-функціональних властивостей біологічних мембран за дії різних фізико-хімічних чинників.

Геометричні параметри клітин крові відіграють суттєву роль в життєдіяльності організму та змінюються при патологічних станах. Збереження нормального індексу сферичності є завданням системи іонного гомеостазу – однієї з найважливіших систем клітини. Багато пошкоджуючих чинників призводять до зміни індексу сферичності клітин і транспортних параметрів їх мембран, що одночасно відбивається на життєздатності еритроцитів і ефективності функціонування кровоносної системи організму в цілому. Оскільки відомо, що транспорт іонів і речовин в еритроцитах людини сильно корелює з різними захворюваннями (малярія, серповидноподібна анемія і т.п.), дуже важливо визначати транспортні шляхи, а також механізми та фізіологічні параметри, що лежать в основі змін швидкостей транспорту, щоб знайти фармакологічні речовини для пригнічення або підвищення проникності мембран. Важливим параметром, що має бути прийнятим до уваги при вивченні механізмів проникності мембран, є об'єм клітини. Так, наприклад, зростання об'єму еритроцитів веде до активації котранспорту калію та хлору (цей шлях не діє в еритроцитах з нормальним об'ємом) [16]. Визначення транспортних і геометричних параметрів еритроцитів може служити інформативним діагностичним тестом патологічних станів крові.

Ретельний розгляд процесу гіпотонічного гемолізу приводить до важливих висновків щодо розкиду параметрів в популяції еритроцитів, зокрема геометричних. Такий розкид даних є наслідком не тільки похибок вимірювань. Неоднорідність популяції еритроцитів не є випадковою, а характеризує стан системи крові в цілому [17]. Тобто сукупність еритроцитів є закономірно неоднорідною множиною, в якій суттєву інформацію містить саме неоднорідність розподілу клітин за їх властивостями. Вимірювання геометричних параметрів еритроцитів є само по собі дуже складною експериментальною задачею [18,19]. Раніше індекс сферичності в популяції еритроцитів вимірювався шляхом фотографування окремих клітин і розрахунку цього геометричного параметра за профілем їх збільшеного фотографічного зображення [20]. Головним недоліком цього методу є його надзвичайна трудомісткість та складність встановлення геометричної форми клітин за зображенням їх профілів. Відомий також метод лазерного цитомоніторингу для визначення індексу сферичності [21]. Головним недоліком цього методу є те, що для кількісного визначення розподілу клітин за індексом сферичності потрібна побудова калібрувальних функцій для кожної проби, що досліджується, окремо. Визначення загальної картини розподілу значно ускладнюється через необхідність виконання таких вимірювань на великій множині клітин. Тому, розробка нових підходів до вирішення задач такого ґатунку є надзвичайно актуальною і корисною для впровадження нових методів діагностики захворювань та вивчення їх впливу на стан популяції еритроцитів.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертація виконана в рамках науково-дослідних бюджетних робіт, виконаних на замовлення академії наук України у відділі низькотемпературного консервування біологічних об'єктів: "Вивчення ролі фізико-хімічних факторів у розвитку кріопшкоджень і кріозахисту біологічних об'єктів. Оптимізація етапів технологічного процесу

кріоконсервування клітин і тканин” (1986-1990 рр.), № держреєстрації 01870065544; “Вивчення механізмів кріопошкодження і кріозахисту біоб’єктів на основі синтезу мембранної і фазової теорій побудови клітини” (1991-1995рр.), № держреєстрації 01944005303; “Розробка та виготовлення пересувного мікрооб’ємного гематологічного аналізатора для експрес-діагностики захворювань променевого генезу”, що виконувалась згідно договору з МОЗ України №172-91/11 від 1.06.1991 (1991-1994 рр.); науково-дослідної бюджетної теми, яка виконувалась за постановою Бюро ВМББіКФ Президії НАН України від 14.01.1996 р. “Побудова та експериментальна перевірка кількісної теорії кріоконсервування біоб’єктів” (1996-2000), № держреєстрації 0100U004235; науково-дослідної теми, що виконується за постановою Бюро ВМББіКФ Президії НАН України від 30.01.2001 р. “Експериментальне вивчення та кількісне моделювання процесів, які відбуваються в мембранах клітин при кріоконсервуванні біологічних об’єктів” (2001-2005 рр.), № держреєстрації 0100U003479.

Мета і задачі дослідження

Метою дослідження є розробка нових методів визначення коефіцієнтів пасивної проникності та розподілу за індексом сферичності еритроцитів людини і з’ясування механізмів проникності мембран еритроцитів для неелектролітів та розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяціях різних донорів.

Для досягнення мети були вирішені такі задачі:

1. На підставі фундаментальних уявлень теорії необоротних процесів, з урахуванням рівнянь руху окремих компонентів отримати вираз для джерела ентропії та зв’язок коефіцієнтів тертя із загальноживаними параметрами трансмембранного масопереносу.
2. Побудувати фізико-математичну модель гіпотонічного гемолізу у водних розчинах проникаючої або непроникаючої речовини з урахуванням сучасних

уявлень про флуктуаційне утворення пори в ізотропно розтягнутій мембрані сфероцита.

3. Виходячи з побудованої біофізичної моделі явища гіпотонічного гемолізу розробити алгоритм визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів до неелектролітів шляхом вимірювання часу 50%-го гемолізу у водних розчинах проникаючої речовини методом малокутового розсіювання світла.
4. Розробленим методом дослідити вплив фізико-хімічних та геометричних параметрів молекул на їх проникність крізь мембрани нативних еритроцитів людини та інкубованих з блокатором білкових каналів (pCMBS).
5. Теоретично розглянути вплив геометричних та фізико-хімічних параметрів молекул на особливості їх проникання крізь водні білкові пори сталого розміру.
6. Дослідити вплив температури на пасивну проникність мембран еритроцитів для неелектролітів.
7. На підставі фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу у розчинах непроникаючої речовини та експериментального визначення осмотичної крихкості еритроцитів методом малокутового розсіювання світла розробити метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності.
8. Розробленим методом визначити особливості розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяціях здорових дорослих донорів, у хворих з ендокринною патологією та у пуповинній крові людини, дослідити вплив температури на розподіл еритроцитів за індексом сферичності.

Об'єкт дослідження. Механізми трансмембранного масопереносу в еритроцитах людини, розкид біофізичних параметрів клітин в популяції, вплив температури на структурно-функціональний стан мембран еритроцитів.

Предмет дослідження. Розробка методів визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для електрично нейтральних речовин та

щільності розподілу еритроцитів у популяції за індексом сферичності. Взаємозв'язок між параметрами молекул та їх здатністю до проникання крізь біологічні мембрани. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяціях здорових донорів, при ендокринних патологіях та в пуповинній крові людини.

Методи дослідження. Для аналізу процесів трансмембранного масопереносу використовували фундаментальні принципи термодинаміки необоротних процесів, теорії пружності тонких оболонок при кінцевих деформаціях, теорії випадкових процесів і гідродинаміки (за малих чисел Рейнольдса), метод асимптотичного інтегрування системи сингулярних рівнянь з малим параметром.

Для теоретичного обґрунтування експериментального визначення кінетичних кривих гемолізу методом малокутового розсіювання світла застосовували теорію Мі розсіювання світла сферичними однорідними частинками в наближенні аномальної дифракції.

Кінетику гіпотонічного гемолізу в розчинах проникаючих та непроникаючих речовин реєстрували методом малокутового розсіювання світла. Коефіцієнти пасивної проникності мембран еритроцитів до електронеутральних речовин та щільність розподілу еритроцитів в популяції за індексом сферичності визначали за розробленими на підставі фізико-математичних моделей гемолізу в розчинах проникаючої та не проникаючої речовин алгоритмами.

Наукова новизна одержаних результатів

В роботі вперше отримані співвідношення між загальноприйнятими транспортними характеристиками біомембран і коефіцієнтами тертя для випадку замкнутої рухомої вибірково проникної мембрани довільної форми. Визначено джерело ентропії для необоротних процесів в багатокомпонентних розчинах з явним урахуванням рівнянь руху окремих компонентів. Створена удосконалена фізико-математична теорія

гіпотонічного гемолізу в розчинах проникаючої речовини, яка враховує існуючі експериментальні характеристики цього процесу і спирається на уявлення про флуктуаційне утворення макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані. На підставі розробленої теорії створено новий удосконалений метод визначення коефіцієнтів пасивної проникності мембран еритроцитів для електронеутральних речовин, який спирається на аналітичні, а не на чисельні, рішення системи диференціальних рівнянь, що описують процеси трансмембранного масопереносу. Розробленим експериментальним методом та теоретично досліджено механізми проникання малих електронеутральних молекул крізь мембрани еритроцитів. Показано існування двох альтернативних шляхів проникання низки речовин (білкового і ліпідного), вперше отримано кількісні співвідношення проникностей цими шляхами і залежність цих кількісних характеристик від фізико-хімічних та геометричних параметрів молекул. Ретельно досліджено температурні залежності проникності еритроцитів для неелектролітів, які надали можливість встановити зв'язки між термоіндукованими процесами в мембранах та її пасивною проникністю. На підставі фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу в розчині непроникаючої речовини розроблено оригінальний метод визначення щільності розподілу еритроцитів в популяції за індексом сферичності. Розробленим методом вперше отримано розподіл клітин за цим параметром в популяціях еритроцитів здорових дорослих донорів та в пуповинній крові людини. Показано вплив ендокринних патологій на стан еритроцитарної популяції.

Практичне значення одержаних результатів

Розроблений метод визначення коефіцієнтів проникності до неелектролітів мембран еритроцитів людини є простим і доступним і може широко використовуватись в наукових дослідженнях при вивченні впливу зовнішніх та внутрішніх чинників на мембрани еритроцитів. Отримані в роботі значення коефіцієнтів проникності низки кріопротекторів а також

досліджені механізми їх проникання можуть бути використаними при розробці нових та для пошуку шляхів вдосконалення існуючих методів кріоконсервування. Температурні залежності коефіцієнтів проникності також є дуже корисними для розробки протоколів низькотемпературного консервування. Розроблений оригінальний метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності може бути використаний для діагностики захворювань кровотворної системи та інших патологічних станів людини. Отримані цим методом кількісні характеристики стану популяції еритроцитів можуть відкрити нові шляхи для розуміння розвитку тієї чи іншої патології та методів її лікування. Ця характеристика є також дуже важливою при виборі зразків крові для подальшого кріоконсервування і дозволить завчасно вибраковувати непридатні для низькотемпературного консервування зразки, що може забезпечити суттєвий економічний ефект.

Особистий внесок здобувача

Дисертація є самостійним дослідженням здобувача. Автору дисертаційної роботи належить вибір теми, визначення мети і задач дослідження. Здобувачем особисто отримані експериментальні дані в усіх розділах дослідження, проведена їх статистична обробка. Теоретична частина роботи виконувалась самостійно за консультативної участі докт. біол. наук Гордієнка Є.О. Автором роботи самостійно проаналізовані отримані результати та зроблені висновки.

У спільних наукових публікаціях співавтори приймали участь в постановці окремих експериментів та обговоренні результатів. В роботі використовувались речовини, синтезовані та очищені докт. біол. наук Ліннік Т.П. та канд. хім. наук Коцкій С.В., з якими обговорювались фізико-хімічні та геометричні параметри молекул цих речовин. При дослідженні еритроцитів людей з ендокринними патологіями діагноз захворювання встановлювався лікарем-ендокринологом, канд. мед. наук Македонською В.О., яка надавала

консультації з питань впливу ендокринних патологій на організменому та клітинному рівнях.

Апробація результатів дисертації

Матеріали дисертаційної роботи доповідались і обговорювались на II Всесоюзній конференції з теоретичних та прикладних питань кріобіології (Харків, 1984); I Міжнародній конференції молодих вчених країн СЕВ (Братіслава, 1985); Міжнародній конференції “Досягнення і перспективи розвитку кріобіології і кріомедицини (Харків, 1988); II Міжнародній конференції “Успіхи сучасної кріобіології” (Харків, 1992); I з’їзді Українського товариства кріобіології і кріомедицини (Харків 1995); II з’їзді Українського біофізичного товариства (Харків, 1998); 31, 33 та 36 щорічних нарадах Міжнародного товариства кріобіології (Кіото, Японія, 1994; Індіанаполіс, США 1996; Марсель, Франція 1999); Всеукраїнській конференції “Успіхи і перспективи розвитку кріобіології і кріомедицини” (Харків, 2001); III з’їзді Українського біофізичного товариства (Львів, 2002); XIV конгресі Європейської асоціації дослідження червоних клітин (Роскофф, Франція, 2003).

Публікації

За матеріалами дисертації опубліковано 48 наукових робіт, з них 34 статті у фахових наукових виданнях, 2 деклараційні патенти України на винаходи, 12 тез доповідей на міжнародних та національних наукових конференціях.

РОЗДІЛ I

СУЧАСНІ УЯВЛЕННЯ ПРО ПАСИВНУ ПРОНИКНІСТЬ БІОЛОГІЧНИХ МЕМБРАН ТА ФУНКЦІОНАЛЬНЕ ЗНАЧЕННЯ ФОРМИ ЕРИТРОЦИТІВ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

1.1. Методи визначення проникності біологічних мембран

Плазматична мембрана клітини є ключовою структурою, за допомогою якої клітина відмежовується від зовнішнього середовища та взаємодіє з ним. Маючи селективну проникність до різних речовин і систему механізмів активного транспорту, вона забезпечує постійність складу внутрішньоклітинного середовища (гомеостаз), а також захищає клітину від дії негативних чинників зовнішнього середовища. Пасивна проникність клітинної мембрани визначається її загальною структурою - властивостями окремих компонентів, що входять до її складу, а також системою взаємодій між ними. Уявлення про механізми проникності біологічних мембран розвивались разом з уявленнями про їх структурну організацію і взаємодоповнювали одні одних.

Термодинамічний підхід до описання та визначення однієї з головних властивостей мембран - її проникності - розвивався незалежно від конкретних уявлень про структуру мембран. Ключовою роботою в цьому напрямку стала робота Kedem, Katchalsky [2]. Автори зазначили, що незважаючи на велику кількість інформації, накопиченої щодо феномена проникності, відомі на той час рівняння для потоків речовин незадовільно описували фізичні властивості мембран, а дані про проникність, отримані різними методами, важко порівняти кількісно. В цій роботі, виходячи з фундаментальних принципів термодинаміки необоротних процесів в лінійному наближенні, були отримані узагальнені рівняння, які були зручними для подальшого їх використання в аналізі даних щодо проникності

біологічних мембран. Зокрема, була показана необхідність використання трьох коефіцієнтів, які в різних конкретних випадках характеризують мембрану, для адекватного описання процесу трансмембранного масопереносу в розчині, який, крім розчинника, містить ще одну проникаючу крізь мембрану електрично нейтральну речовину. Термодинамічний розгляд процесів масопереносу крізь біологічну мембрану проведено нами в роботі [22] і в розділі 3.

У відповідності до термодинаміки необоротних процесів, потоки імпульсу та маси є функціями всіх термодинамічних сил, що діють в системі, а саме лінійно залежать від них, якщо є малими. У випадку двох потоків J_1 та J_2 , що залежать від двох сил X_1 та X_2 , взаємозв'язок між трансмембранними питомими потоками і силами має вигляд

$$J_1 = L_{11}X_1 + L_{12}X_2$$

$$J_2 = L_{21}X_1 + L_{22}X_2$$

де L_{ij} - так звані феноменологічні коефіцієнти.

Згідно зі співвідношеннями взаємності Онзагера перехресні коефіцієнти дорівнюють один одному, так що $L_{12}=L_{21}$. Тоді, для двокомпонентної системи (розчинник-розчинена речовина) та вибірково проникної мембрани маємо

$$J_v = L_p \Delta p + L_{pD} \Delta \pi_s$$

$$J_D = L_{Dp} \Delta p + L_D \Delta \pi_s$$

$$L_{Dp} = L_{pD}$$

Де $J_v = v_1 J_1 + v_2 J_2$ - питомий об'ємний потік крізь вибірково проникну мембрану, v_1 та v_2 - об'єм молю першої та другої речовини відповідно, J_1 та J_2 - кількість молів першої та другої речовини, що проходять крізь одиничну площу мембрани за одиницю часу, $J_D = J_1 - (n_1/n_2)J_2$ - так званий обмінний потік, n_1 і n_2 - молярні концентрації першої та другої речовини, $\Delta \pi_s$ і Δp - градієнти осмотичного та гідростатичного тиску на мембрані.

Фізичний сенс третього перехресного коефіцієнту L_{pD} полягає в тому, що питомі потоки (об'ємний та обмінний) не є незалежними, і градієнт

концентрацій розчиненої речовини викликає також і об'ємний потік, навіть коли $\Delta\pi=0$. В той же час, різність гідростатичного тиску викликає не тільки об'ємний потік, але і потік розчиненої речовини відносно розчинника, відомий як ультрафільтрація. Перехресний коефіцієнт L_{pD} пов'язаний з так званим коефіцієнтом відбиття σ ($\sigma=L_{pD}/L_p$). Ясно, що для неселективної мембрани $\sigma=0$, для ідеально селективної мембрани, проникної тільки для розчинника, $\sigma=1$.

Автори роботи [2] показали, що рівняння, отримані ними на засадах термодинаміки необоротних процесів, більш адекватно, ніж закон Фіка, описують процеси пасивного проникання речовин крізь біологічні мембрани і дають можливість визначення фізично обґрунтованих кількісних параметрів процесу трансмембранного переносу (коефіцієнта фільтрації L_p , коефіцієнта проникності L_DRT та коефіцієнта відбиття σ) з експериментальних даних. В подальшому всі дослідники, які вивчали проникність тих чи інших мембран до електрично нейтральних речовин, звертались до результатів роботи [2] і використовували їх для отримання чисельних значень транспортних характеристик біомембран.

У випадку, коли крізь клітинну мембрану, крім розчинника, проникає тільки одна електронейтральна речовина, а інші компоненти оточуючого мембрану розчину є непроникаючими, рівняння Кедем-Качальського набувають вигляду

$$\begin{aligned}\dot{V} &= SL_p[\sigma_s\Delta\pi_s + \Delta\pi_p - \Delta p] \\ \dot{N}_s^{\text{in}} &= -S\omega_s\Delta\pi_s + (1 - \sigma_s)\bar{n}_s\dot{V}\end{aligned}\quad (1.1)$$

Де S - площа поверхні мембрани, $\dot{V}$ - швидкість зміни об'єму клітини, $\dot{N}_s^{\text{in}}$ - швидкість зміни кількості молів розчиненої всередині клітини проникаючої крізь мембрану речовини, σ_s і $K_s = \frac{\omega_s}{RT}$ - коефіцієнт відбиття та коефіцієнт проникності клітинної мембрани для проникаючої крізь неї речовини, $\Delta\pi_s$ і $\Delta\pi_p$ - трансмембранні перепади осмотичного тиску проникаючої та

непроникаючих речовин відповідно, $\bar{n}_s$ - так звана “середня” концентрація проникаючої крізь клітинну мембрану речовини

$$\bar{n}_s = \frac{\Delta\pi_s}{RT \ln(n_s^{\text{in}} / n_s^{\text{out}})}$$

де n_s^{in} і n_s^{out} - відповідно концентрації проникаючої крізь мембрану речовини всередині клітини та поза нею.

В монографії [15] шляхом модифікації рівнянь (1.1) були отримані більш зручні для розрахунків диференціальні рівняння:

$$\begin{aligned} \frac{d}{dt} y &= \gamma L_p [\sigma_s \Delta\pi_s + \Delta\pi_p - \Delta p] \\ \frac{d}{dt} \pi_s^{\text{in}} &= - \left[\gamma K_s \Delta\pi_s + \sigma_s \pi_s^{\text{in}} \frac{dy}{dt} \right] \frac{1}{y - \alpha} \end{aligned} \quad (1.2)$$

де $y = V/V_0$ - відносний об'єм клітини, V - поточне значення об'єму, V_0 - початковий об'єм клітини, π_s^{in} - осмотичний тиск розчиненої всередині клітини проникаючої крізь мембрану речовини, α - об'ємна фракція осмотично неактивних речовин у внутрішньоклітинному розчині, γ - поверхнево-об'ємне відношення.

Перехід від рівнянь (1.1) до диференціальних рівнянь (1.2) можна здійснити завдяки тому, що вираз для утворення ентропії P_m за рахунок ізотермічного трансмембранного переносу речовини у випадку, що розглядається, є

$$P_m = - \frac{(\Delta\mu_s)_T}{T} \frac{d}{dt} N_s^{\text{in}} - \frac{(\Delta\mu_\omega)_T}{T} \frac{d}{dt} N_\omega^{\text{in}} \quad (1.3)$$

і термодинамічні сили $(\Delta\mu_s)_{P,T}$ і $(\Delta\mu_\omega)_{P,T}$ пов'язані між собою співвідношенням Гібса-Дюгема

$$N_s^{\text{in}} (\Delta\mu_s)_{P,T} + N_\omega^{\text{in}} (\Delta\mu_\omega)_{P,T} = 0 \quad (1.4)$$

де $\Delta\mu_s$ і $\Delta\mu_\omega$ - трансмембранні перепади молярного хімічного потенціалу розчиненої речовини та розчинника, T - абсолютна температура, N_s^{in} і N_ω^{in} -

відповідно кількість молів розчиненої речовини та розчинника (води) в клітині.

Підстановка (1.4) в (1.3) з урахуванням тієї обставини, що для слабких розчинів

$$N_{\omega}^{\text{in}} v_{\omega}^{\text{in}} \approx V, \quad \frac{\Delta \mu_{\omega}}{v_{\omega}^{\text{in}}} = \Delta \pi_s, \quad \frac{N_s^{\text{in}}}{N_{\omega}^{\text{in}} v_{\omega}^{\text{in}}} \approx n_s^{\text{in}}$$

приводить до наступного виразу для утворення ентропії

$$P_m = -\frac{\Delta \pi_s}{T n_s^{\text{in}}} \frac{d}{dt} N_s^{\text{in}} + \bar{v}_{\omega}^{\text{in}} \frac{(\Delta \pi_s + \Delta \pi_p)}{T} \frac{d}{dt} N_{\omega}^{\text{in}} - \left(\bar{v}_s^{\text{in}} \frac{d}{dt} N_s^{\text{in}} + \bar{v}_{\omega}^{\text{in}} \frac{d}{dt} N_{\omega}^{\text{in}} \right) \frac{\Delta P}{T} \quad (1.5)$$

($\bar{v}_s^{\text{in}}$ і $\bar{v}_{\omega}^{\text{in}}$ - об'єм одного моля розчиненої речовини та розчинника відповідно). Далі, виходячи з виразу (1.5) для утворення ентропії, стандартним методом отримуємо (1.2).

Як правило, експериментально визначають зміну об'єму клітин (або ліпосом) в часі при їх вміщенні в розчин проникаючої речовини. Для клітин, що їх мають дослідники у великих кількостях (наприклад, еритроцити), часто застосовують метод розсіювання світла суспензією клітин. Дослідження у випадку еритроцитів ускладнюються в зв'язку з високим значенням проникності еритроцитів для води. Solomon із співавторами [3,6,7,23-27] застосував так звану систему "зупиненого потоку" і впродовж багатьох років використовував її для вивчення параметрів проникності еритроцитів. В цій системі визначений об'єм еритроцитів з певним осмотичним статусом швидко змішується з іншим розчином, що містить проникаючу речовину, проникність до якої визначається. Клітинний об'єм реєструється оптичною системою за розсіянням або поглинанням світла. В роботі [23] визначали коефіцієнт відбиття для мочевины так званим методом апроксимації до нульового часу. Цей метод базується на першому з рівнянь (1.1) або (1.2) для об'ємного потоку. Спочатку проводиться серія експериментів для визначення L_p , в якій варіюється $\Delta \pi_p$, при підтримці $\Delta \pi_s = 0$. Коефіцієнт фільтрації L_p , помножений на площу поверхні мембрани, очевидно, визначається з нахилу

залежності $\dot{V}$ від $\Delta\pi_p$. Друга аналогічна серія експериментів проводиться для визначення $\sigma_s L_p S$. Для цього варіюється $\Delta\pi_s$ при підтримці $\Delta\pi_p=0$. Коефіцієнт відбиття σ_s визначається безпосередньо за нахилом залежності $\dot{V} = f(\Delta\pi_s)$, як

$$\sigma_s = \frac{\dot{V}}{SL_p}.$$

Оскільки $\Delta\pi_s$ є точно відомою величиною тільки в початковий

момент часу, залежність $\dot{V} = f\left(\frac{\Delta\pi_s}{SL_p}\right)$ екстраполюється до величини в

нульовий момент часу. Часову залежність $\dot{V} = f(t)$ визначали за допомогою системи "зупиненого потоку", суміщеної з приладом для вимірювання інтенсивності розсіювання світла. Визначали часовий хід швидкості зміни об'єму еритроцитів в низці розчинів з різними $\Delta\pi_p$ або $\Delta\pi_s$. Для корекції оптичних ефектів, що пов'язані з перерозподілом розчинених речовин між клітинами та оточуючим їх середовищем, проводили контрольні експерименти, в яких клітини змішували з ізотонічним буфером у відсутності проникаючої речовини, наприклад мочевины. Отримані результати зміни розсіювання, не пов'язані зі зміною об'єму, віднімали від тих, що отримали в присутності проникаючої речовини в неізотонічній концентрації. Отримані скориговані дані екстраполювали до нульового моменту часу. Виміряні таким чином значення коефіцієнтів відбиття мембран еритроцитів для мочевины та етиленгліколю становили 0,6 та 0,63 відповідно. Сумніви в справедливості такої екстраполяції були висловлені в роботі [9]. В роботі [10] ці результати також були піддані критиці. Автори показали, що результати аналізу залежать від виду апроксимуючої функції для часової залежності зміни об'єму біля нульового моменту часу. Апроксимація також залежить від довжини інтервалу, що використовується для апроксимації. Самі автори роботи [10] виміряли коефіцієнти відбиття для низки гідрофільних спиртів методом ЕПР і отримали величини, близькі до одиниці. Автори роботи [28] отримали для мочевины $\sigma_s=0,79$, а для етиленгліколю $\sigma_s=0,86$. Насамкінець, автори роботи [29], усунувши артефакти, які мали місце в попередніх

роботах, знайшли для мочевины $\sigma_s=0,95$. Для етиленгліколю уточнене значення коефіцієнту відбиття за даними цих авторів становить 1. Після критики методу апроксимації до нульового часу Toon, Solomon [7] представили роботу, в якій коефіцієнт відбиття для мочевины та деяких алканолів визначали за зміною об'єму тіней еритроцитів за допомогою флюоресцентного зонду [30]. Для рожевих тіней еритроцитів вони отримали величину $\sigma_s=0,69$ для мочевины та $\sigma_s=0,92$ для 1,2-пропандіолу. Автори роботи [7] пов'язують значення коефіцієнту відбиття з механізмами проникання крізь мембрану, стверджуючи, що якщо речовина проникає крізь мембрану тільки шляхом розчинення в мембрані, $\sigma_s=1$, при проходженні речовин крізь водний канал σ_s набуває значень, менших за одиницю.

Зроблені спроби скоригувати коефіцієнт відбиття для випадку альтернативних шляхів проникання $\sigma_{s,cor}=\sigma_s-\omega_s V_s/L_p$. Але за своїм фізичним сенсом цей коефіцієнт адекватно відображає взаємозв'язки між потоками тільки у випадку спільного об'ємного потоку. При наявності альтернативних шляхів проникання цей коефіцієнт не є адекватною характеристикою цього взаємозв'язку.

Коефіцієнти проникності для електронейтральної речовини (ω_s), звичайно, також визначаються згідно з термодинамічними рівняннями [2] з часової залежності об'єму клітин, вміщених в розчин відповідних речовин. Автори роботи [4] розробили метод мінімуму для визначення коефіцієнта проникності. Згідно з цим методом, клітини в ізоосмотичному буферному розчині змішуються з таким же розчином, що містить проникаючу речовину в гіпертонічній концентрації. В цих умовах клітини спочатку зморщуються до мінімального об'єму, а потім знов набрякають до кінцевого об'єму, при якому градієнти хімічних потенціалів проникаючої речовини і води падають до нуля. ω_s визначається з похідної від швидкості зміни об'єму в точці його мінімуму.

Згідно з (1.2) в момент часу, коли об'єм сягає мінімального значення, тобто $dy/dt=0$, маємо

$$\left(\frac{d}{dt}\pi_s^{\text{in}}\right)_{\min} = -\frac{1}{y_{\min} - \alpha}[\gamma\omega_s\Delta n_s] \quad (1.6)$$

З іншого боку, диференціюючи перше з рівнянь (1.2) за часом, отримуємо

$$\frac{d^2}{dt^2}V = SL_p RT \left[\sigma_s \frac{d}{dt}\Delta n_s + \frac{d}{dt}n_p \right]$$

Концентрація не проникаючої крізь мембрану речовини всередині клітини, очевидно, дорівнює

$$n_p^{\text{in}} = n_p^{\text{in}}(0) \frac{1 - \alpha}{y - \alpha}$$

де α - об'ємна фракція осмотично неактивних речовин всередині клітини.

Очевидно $\frac{d}{dt}n_p^{\text{in}} = 0$ в точці мінімуму, де $\frac{dy}{dt} = 0$. Якщо загальний об'єм

клітин в суспензії має набагато менше значення, ніж об'єм позаклітинного розчину, можна вважати, що концентрація розчинених в оточуючому клітини середовищі речовин практично не змінюється внаслідок перерозподілу речовин між клітинами та позаклітинним розчином. Тому

$$\frac{d}{dt}n_s^{\text{out}} \approx 0 \text{ і } \frac{d}{dt}n_p^{\text{out}} \approx 0$$

Таким чином, в точці, де об'єм клітини сягає мінімуму

$$\left(\frac{d^2}{dt^2}V\right)_{\min} = SL_p RT \sigma_s \left(\frac{d}{dt}n_s^{\text{in}}\right)_{\min} \quad (1.7)$$

Порівнюючи (1.6) і (1.7), отримуємо

$$\omega_s = -\frac{(V_{\min} - V_n) \left(\frac{d^2V}{dt^2}\right)_{\min}}{\sigma_s S^2 L_p RT \Delta n_s}$$

де $V_{\min}$ - мінімальний об'єм клітини, V_n - об'єм осмотично неактивних речовин всередині клітини. Саме цей вираз використовується для визначення коефіцієнту проникності в згаданому вище методі мінімуму.

Експериментальні дані апроксимуються поліномом третього ступеня, величину d^2V/dt отримують з нахилу кривої $dV/dt=f(t)$ в точці мінімального

об'єму. Як видно, розрахунок коефіцієнта проникності ω_s потребує урахування величини осмотично неактивного об'єму, який був визначений для еритроцитів в ізоосмотичних умовах [6,31] і становить 0,43 , а також фракційного вмісту води, який приймається за даними роботи [32] приблизно рівним 0,71.

Рівняння, отримані в роботі [2], використовувались в низці робіт інших авторів [5,8,33]. В роботі [8] описується три основних експериментальні підходи до визначення коефіцієнтів проникності: (1) шляхом визначення зміни з часом клітинного об'єму вимірюванням гематокриту, кондуктометричним методом або за зміною оптичної густини клітинної суспензії; (2) вимірюванням кількості проникаючої речовини (наприклад гліцерину) в клітинах хімічним або ізотопним методом; (3) вимірюванням часу, необхідного для гемолізу в гіпотонічному за непроникаючою речовиною середовищі. Автори використали в своїй роботі третій із зазначених методів для визначення проникності мембран еритроцитів бика для гліцерину. Для цього еритроцити вміщували в гіпотонічний за непроникаючою речовиною розчин гліцерину із заданою концентрацією. В певні проміжки часу з надосадка відбирали проби, в яких визначали гемоліз. Разом з цим розраховували теоретичний хід зміни об'єму еритроцита у часі за рівняннями Кедем-Качальського за різних значеннях коефіцієнта проникності. При цьому, значення інших фігуруючих в рівняннях клітинних параметрів і критичний об'єм, при якому виникає гемоліз, вважались фіксованими і відомими. Значення коефіцієнта проникності, при якому розрахований час досягнення клітинами критичного об'єму збігається з експериментально визначеним часом 50%-го гемолізу, вважався шуканою величиною.

Недоліки цього методу очевидні. По-перше, визначення зміни об'єму клітин описаним вище методом розсіювання світла є більш точним і менш трудомістким. По-друге, припускається, що гемоліз відбувається одразу, як тільки клітина досягає певного критичного розміру. Іншими словами,

вважається, що час початку гемолізу збігається з часом, необхідним для досягнення клітинами критичного об'єму. Більше того, деякі автори припускали, що гемоліз відбувається миттєво після того, як еритроцит в процесі набрякання набуває сферичної форми. Значення критичного об'єму при такому припущенні, очевидно, є рівним $V_k = (S_0)^{3/2} / 6\sqrt{\pi}$, де S_0 - значення площі поверхні мембрани еритроцита у фізіологічному розчині. Крім того, в більшості робіт по вимірюванню коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для електронейтральних речовин трансмембранний перепад гідростатичного тиску і пов'язаний з ним ізотропний натяг мембрани безпосередньо не приймалися до уваги. Але, як показали Saari, Beck [12], припущення про те, що гемоліз відбувається одразу ж після досягнення ними деякого фіксованого критичного об'єму, не відповідає дійсності. Вони довели, що час t_h , за який відбувається гіпотонічний гемоліз в суспензії еритроцитів до рівня 50%, складається з двох доданків: $t_h = t_k + t_s$. При цьому, t_k є час, необхідний для досягнення заданого критичного об'єму, який може бути визначений шляхом чисельного рішення рівнянь Кедем-Качальського і залежить від початкового об'єму. Другий доданок t_s , за думкою авторів, представляє собою проміжок часу, необхідний для утворення в мембрані клітини, яка вже досягла критичного об'єму, пори, крізь яку гемоглобін виходить з клітини назовні. Автори роботи вважали, що час t_s не залежить від початкового об'єму клітини V_0 . Задаючи різні початкові значення клітинного об'єму шляхом попереднього занурення клітин в розчини із заданим значенням осмотичного тиску, вони експериментально вимірювали залежність $t_h = t(V_0)$. Шляхом екстраполяції цієї залежності до значення $t_h(V_{kp})$, при якій, очевидно, $\lim_{V_0 \rightarrow V_k} t_k \rightarrow 0$, вони визначали t_s як $\lim_{V_0 \rightarrow V_k} t_h$. Виявилось, що t_s , яке автори роботи [12] назвали сферичним періодом, складає суттєву частку повного часу гемолізу t_h . При цьому відносний внесок сферичного періоду t_s в t_h зростає зі збільшенням коефіцієнту проникності клітинної мембрани для проникаючої в клітину речовини. В роботі [34] також показано, що в

гіпотонічному розчині гліцерину час набрякання становить близько 50% від загального часу гемолізу t_h . Аналогічні результати були отримані в [35] для еритроцитів собаки та кролика у водних розчинах проникаючої в клітини тіомочевини ізотонічної концентрації. Наявність внеску сферичного періоду в t_h Saari, Beck [12] пояснювали або затримкою гемолізу під час сферичного періоду внаслідок витоку калію з клітин, котрий передую виходу гемоглобіну з еритроцитів, або тим, що утворення розриву в мембрані є процесом активаційного типу і потребує для його реалізації певного скінченого проміжку часу.

При типовому підході до визначення коефіцієнта проникності мембран еритроцитів для розчиненої в позаклітинному розчині речовини неявно припускається, що викид гемоглобіну з клітин назовні відбувається практично миттєво. Це припущення є сумнівним у світлі уявлень, висунутих в роботах [13-15], у відповідності до яких час, впродовж якого гемоглобін покидає еритроцити при гіпотонічному гемолізі, може бути такого ж порядку, як і час утворення макроскопічної пори в мембрані або навіть перевищувати його.

Недоліком описаного методу визначення коефіцієнта проникності до електрично нейтральних розчинених речовин є також необхідність чисельного рішення рівнянь трансмембранного масопереносу.

Одним зі згадуваних в роботі [8] методів визначення зміни об'єму при дослідженні процесів масопереносу крізь клітинні мембрани є кондуктометричний метод визначення розміру клітин. Електронний лічильник розмірів частинок вперше був впроваджений в 1950 роках. Hempling [36] був одним з перших, хто застосував цей метод для визначення параметрів мембранного транспорту в рівняннях Кедем-Качальського. В роботі [36] вони оцінювали ці параметри для суміщеного транспорту води та ДМСО крізь плазмалему мегакаріоцитопоектичних клітин щура в культурі. McGann et al. [37,38] застосували цей метод для визначення транспортних властивостей гранулоцитів людини. Розповсюдження цього методу в

багатьох лабораторіях для різних видів досліджень, включаючи дослідження транспортних характеристик клітинних мембран, пояснюється розробкою серійних приладів такого гатунку і їх доступністю. Суть метода полягає в тому, що розбавлена суспензія клітин під дією заданого перепаду тиску протікає крізь невеликий отвір, розмір якого має порядок розміру клітин. При проходженні клітини крізь отвір вона викривлює електричне поле, яке підтримується на ньому. Вимірюються стрибки електричного опору при проходженні клітин крізь отвір, амплітуда яких залежить, зокрема, від об'єму клітин. Автори роботи [39] припустили, що ця залежність є лінійною. Проведені ними вимірювання показали, що клітинний об'єм в популяції еритроцитів має бімодальний розподіл, що викликало сумніви у придатності методу вимірювання. Виявилось, що якщо виключити з аналізу широкі імпульси опору, які відповідають проходженню клітин крізь отвір поблизу його краю, то розподіл стає нормальним. До того ж виникає проблема сумнівності калібрування електронних імпульсів в залежності від об'єму для несферичних клітин, зокрема еритроцитів. Хоча, в принципі, можна виключити артефакти, пов'язані з неоднаковою орієнтацією несферичних клітин і викривленням однорідності електричного поля, ми вважаємо, що результати вимірювань клітинного об'єму за допомогою апертурного лічильника, отримані в [39], а також аналогічні результати, отримані в роботі [40], є недостатньо надійними. До того ж цей метод потребує порівняно великих об'ємів клітинних суспензій. Цей метод, як і описаний вище метод розсіювання світла, дає усереднені значення параметрів по великій кількості клітин. Це означає, що отримані цими методами дані мають статистичне обґрунтування всередині досліджуваної популяції, але не відображають розподіл клітин за властивостями в її межах.

В роботі [11] проникність мембран еритроцитів собаки вивчали за допомогою радіоактивно мічених речовин: трітійової води, ^{14}C -мічених ліпофільних (метанол, етанол, антипирін) та гідрофільних (ацетамід, мочеви́на) речовин. Клітини, відділені від плазми центрифугуванням,

змішувались з позаклітинним маркером ^{125}J -(сироваткового альбуміну), втягувались в поліетиленові трубки, які запечатували з одного кінця. Клітини пакували в щільний осад центрифугуванням. В трубку вприскували радіоактивно мічену речовину, проникність до якої досліджувалась. Клітини інкубували при певній температурі. У визначені проміжки часу трубки заморожували і нарізали тонкими шарами 0,5-1,0 мм з того кінця, в який вприскували розчин проникаючої речовини, і визначали їх радіоактивність. Коефіцієнти дифузії визначали за рівняннями для одномірної напівобмеженої дифузії крізь гомогенне середовище за розташуванням кількості носія

$$C(x,t) = m_0(\pi Dt)^{-1/2} \exp(-x^2/4Dt)$$

Графік залежності $\ln C$ від x^2 (де x - відстань від точки введення) є прямою з нахилом $1/4Dt$, яке дає ефективні значення D , оскільки t відоме. Коефіцієнти проникності розраховували з коефіцієнтів дифузії в системі з паралельними шляхами. При цьому вважалось, що клітини упаковані в регулярну структуру з локально рівноважними дифузійними внутрішньоклітинними потоками в одномірному наближенні, які є паралельними з одномірними позаклітинними шляхами, з обміном проникаючої речовини між ними. Проникність мембран розраховувалась шляхом розділення опору дифузії, який створюють інтактні плазматичні мембрани спактованих клітин у трубці, від опору інших компонентів, включаючи впливи незмішуваних шарів. Опори цих компонентів визначаються окремо вимірюванням дифузії крізь внутрішньоклітинне середовище (D_2), позаклітинне середовище (D_1), тобто у випадку еритроцитів крізь гемоглобін та плазму відповідно. Чисельні величини P_0 отримували з експериментально визначених D , D_1 і D_2 . Відносний позаклітинний об'єм і довжину клітини в напрямку дифузії визначали з величин кривизни, площі обмінної поверхні клітини і площі перетину для дифузії. Описаний метод надає можливість вимірювати дифузійні коефіцієнти проникності. Але, в той же час, він є дуже трудомістким, а розрахунок коефіцієнтів передбачає ряд наближень та

спрощень, що може привести до помилок у їх визначенні, які важко врахувати.

Оригінальний метод визначення дифузійної проникності мембран еритроцитів для води за допомогою ЯМР-апаратури був запропонований в 1972 році [41]. Як вже зазначалось, проникність еритроцитів для води, як дифузійна, так і осмотична, є дуже високою. Час обміну молекулами води між клітинами та плазмою становить близько 10 мс. Тому визначення цієї характеристики для еритроцитів потребує громіздких методів, на кшталт описаного в попередньому абзаці, або пристрою для здійснення швидкого перемішування потоків (метод зупиненого потоку). Суть методу полягає у вимірюванні часу поперечної релаксації ядерного магнітного резонансу, що спостерігається на протонах води в суспензії еритроцитів. Спонтанний час спин-спинові релаксації (T_2) в еритроцитах становить 90-170 мс [42] в залежності від температури. Якщо T_2 в плазмі зробити дуже коротким (набагато меншим 10 мс), час релаксації системи "плазма+еритроцити" буде визначатись обмінними процесами. На практиці короткий час T_2 в плазмі можна отримати додаванням не проникаючого в клітини парамагнітного іона, наприклад Mn^{2+} , в суспензію. Для нормальних непошкоджених еритроцитів виконується відношення $1/T_{обм} > 1/T_{ер}$. Цей метод має низку переваг. Він більш швидкий та економічний, ніж ізотопний, потребує невеликого об'єму зразків. До того ж інтерпретація результатів, отриманих цим методом, є більш простою і прозорою. Метод набув широкого застосування в дослідженнях дифузійної проникності еритроцитів для води [43-45]. Він був застосований нами для дослідження впливу температури та концентрації електроліту на мембрани еритроцитів людини [46].

Для клітин, кількість яких є обмеженою, були розроблені методи фотореєстрації і визначення розмірів клітин за їх зображенням. Автор роботи [47] визначав гідравлічну провідність (L_p), використовуючи капілярні трубки, Diller [48] розробив мікроскопічний метод "зупиненого потоку" і визначав проникність для води гранулоцитів людини. McGrath [49] сконструював

мікродифузійну камеру. Одна або більше клітин вміщувались в початковий розчин між покривним скельцем та діалізною мембраною, розчини прокачували під діалізною мембраною, зображення клітин реєстрували відеокамерою. Діалізна мембрана використовувалась для прикріплення клітин і утримання їх в полі зору мікроскопа при прокачуванні розчинів. Інший метод фіксації поодиноких клітин в полі зору мікроскопу - прикріплення за допомогою мікроприсосок [50,51]. Ця техніка також дозволяє стежити за об'ємом поодинокі клітини при зміні розчинів безпосередньо під мікроскопом.

Таким чином, розроблено багато варіантів методів визначення термодинамічних коефіцієнтів, що характеризують процеси масопереносу крізь біологічні мембрани. Більшість методів ґрунтується на реєстрації зміни об'єму клітин в процесі перерозподілу речовин між поза- та внутрішньоклітинним середовищем. Майже всі методи потребують спрощення вихідних рівнянь між потоками речовин та термодинамічними силами для отримання коефіцієнтів. Значення шуканих термодинамічних коефіцієнтів залежать від виду апроксимації та граничних умов, на яких базуються спрощення. В деяких випадках, методи, що використовуються, ґрунтуються на хибних уявленнях про перебіг процесів, які супроводжують перерозподіл речовин крізь клітинні мембрани. Високі значення коефіцієнтів фільтрації для мембран еритроцитів обумовлюють складність апаратури для їх визначення. Отже, розробка підходів до визначення коефіцієнтів проникності біологічних мембран залишається актуальною.

1.2. Проникність ліпідних бішарів та біологічних мембран

Мозаїчна модель плазматичної мембрани, що представляє собою білкові ділянки, які пронизують серцевину ліпідних бішарів, є підґрунтям для дослідження трансмембранного транспорту вже на протязі більш ніж 50

років. Вона підкреслює існування принаймні двох паралельних шляхів проникання (білкових та ліпідних) і забезпечує фізичну основу для постуляції існування полярних каналів, або пор, що пронизують мембрану.

Більш ніж 95% фосфоліпідів еритроцитарної мембрани організовані в бішарну конфігурацію. Виключаючи індукцію гексагональної (H_{II}) фази хімічними фузогенами ніякої іншої структурної організації еритроцитарних ліпідів не спостерігається, навіть після такої жорсткої обробки, як фосфоліпазна деградація або протеолітичне розщеплення мембранних протеїнів [52].

Розглянемо властивості ліпідів, які відносяться до першочергової функції ліпідних бішарів, а саме забезпечують селективно проникний бар'єр між двома водними оточеннями. Є багато модельних систем, на яких вивчали проникність ліпідної фази. Наприклад, чорні ліпідні мембрани (BLM), малі уніламелярні везикули (SUV), великі уніламелярні везикули (LUV), або мультиламелярні системи (MLV).

Проникності ліпідних бішарів до води та неелектролітів були оглянуті Fettiplace, Haydon [54]. Рідинно-кристалічні ліпідні бішари виявились несподівано проникними до води і мають коефіцієнти проникності в області 10^{-2} до 10^{-4} см/с. Результати, отримані при використанні BLM-систем, що складались з яєчного фосфатидилхоліну, в розчинах алканолів дали коефіцієнти проникності для води в області $3,3 \times 10^{-3}$ см/с [54], тоді як для MLV з яєчного фосфатидилхоліну, що складались з одного до трьох бішарів, коефіцієнт проникності становив $4,5 \times 10^{-3}$ см/с [55]. При включенні холестерину проникність до води зменшується до величин від 3×10^{-3} до $1,4 \times 10^{-3}$ см/с при максимальній концентрації холестерину за даними Fettiplace [56] та до $0,57 \times 10^{-3}$ см/с за даними Finkelstein [57]. Енергії активації в області 8-13 кКал/Моль (33,6 - 54,6 кДж/Моль) узгоджується з дифузією води крізь вуглеводневу область мембрани [58].

В дослідженні Poznansky et al. [59] гомологічної низки амідів (від формаміду до валераміду) при використанні радіоактивно міченої речовини

та LUV з яєчного лецитину, були отримані коефіцієнти проникності приблизно на два порядки менші, ніж для води. Такі ж коефіцієнти проникності спостерігали для мочевины (4×10^{-6} см/с при 25°C) з приблизно такою ж енергією активації, як для води. Проникність ліпідних мембран зростає зі збільшенням розчинності речовини в ліпіді. Це вказує на те, що для більшості речовин обмежуючим швидкість етапом є входження в ліпідний бішар.

При дослідженні проникності ліпідних бішарів виявили, що чинники, які збільшують порядок і зменшують рухливість у вуглеводневому регіоні, зменшують також і проникність мембрани. Так BLM-системи, які складаються з моногліцеридних плівок демонструють зменшення проникності для води при збільшенні насичення ацильних ланцюгів і їх довжини [56]. Схожі спостереження були проведені для проникності гліцерину та еритрітолу в MLV-системах [53]. Здатність холестерину значно підвищувати порядок в області ацильних ланцюгів також відображається у зменшенні проникних властивостей мембран. Включення холестерину в ефір-фосфатидилхолінові-системи (EPC) або моногліцеридні плівки [56] зменшує проникність води в 5 разів або більше. Схожі ефекти спостерігались для дифузії HCl та проникності гліцерину і еритрітолу [53]. Так само, підвищення температури, яке веде до збільшення рухливості ацильних ланцюгів (безпорядку), спричинює збільшення проникності. Для рідинно-кристалічних систем це відображається високими енергіями активації які виявляють коефіцієнти проникності, що попадають в область від 8 до 20 кКал/Моль (33-85 кДж/Моль) для води, протонів та інших іонів [53].

Слід вказати на проблеми, пов'язані з характеристикою властивостей ліпідів в мембранах. Головною з них є концепція мембранної текучості, яка може найбільше ввести в оману. Наприклад, завжди припускається, що більш насичені ліпіди або присутність холестерину робить мембрану менш "текучою". Це не обов'язково. Строго кажучи, параметр текучості є оберненим до в'язкості мембрани, який в свою чергу є обернено

пропорційним до швидкостей обертової та латеральної дифузії (D_r та D_l відповідно) мембранних компонентів [60]. Таким чином, треба було б очікувати лінійного співвідношення між мембранною текучістю та D_r і D_l , що в експериментах не спостерігається. Включення холестерину у фосфатидилхолінову модельну мембрану (при температурах, вищих за температуру переходу ацильних ланцюгів з гелевого до рідиннокристалічного стану) має малий вплив, або зовсім не впливає на швидкість латеральної дифузії [61,62] і може суттєво збільшити швидкість обертової дифузії [63]. Головним впливом підвищення концентрації холестерину або кількості ненасичених зв'язків є збільшення порядку в вуглеводневому матриці. Збільшення або зменшення порядку кількісно характеризується "параметром порядку", що визначається методом ЯМР або ЕПР. Параметр порядку корелює зі зменшенням або збільшенням проникності.

Терміни "в'язкість" та "текучість" почали використовувати у фізімії для описання властивостей макроскопічних рідких систем. Текучість рідини є оберненою величиною до її в'язкості. Для більшості рідин в'язкість зменшується зі збільшенням температури і збільшується зі збільшенням тиску. При цих умовах єдиний коефіцієнт в'язкості достатньо повно описує певну рідинну систему, принаймні макроскопічно. Терміни "текучість" і "в'язкість" часто використовують у дослідженнях мембран, зазвичай в якісному сенсі, щоб вказати дещо про щільність пакування та/або відносну рухливість ліпідних і білкових компонентів в мембрані. Хоча ці терміни є корисними, вони стають сумнівними при використанні в початковому сенсі по відношенню до високо анізотропної, асиметричної двомірної структури, такої як біологічна мембрана, яка до того ж має товщину в декілька молекул. Ясно, що організація та мобільність ліпідів і білків буде зовсім різною при вимірюванні в площині мембрани та поперек неї. Не тільки ефективна або "середня" текучість біологічної мембрани відрізняється при визначенні в площині або поперек мембрани, але також всередині самої мембранної

структури. Це є наслідком існування градієнтів коливального та орієнтаційного порядків всередині самих ліпідних та білкових молекул. З цих та інших міркувань ясно, що ні один "єдиний коефіцієнт в'язкості" не може адекватно описати рідинні властивості біологічної мембрани. Локальну або "мікрров'язкість" ліпідних і білкових компонентів зазвичай визначають одним або декількома різними спектроскопічними методами. Орієнтаційний порядок та швидкості коливального руху виявляються зазвичай оберненими один до одного, як у випадку переходу фосфоліпідних бішарів з гелевого до рідинно-кристалічного стану, проте обернене співвідношення між порядком і коливальною рухливістю отримується не завжди. Наприклад, присутність інтегральних мембранних білків в мембрані, як було визначено декількома методами, зменшує як швидкості коливального руху, так і орієнтаційний порядок фосфоліпідних вуглеводневих ланцюгів. Вважається найбільш ймовірним, що зміна температури, складу жирних кислот, вмісту холестерину, зазвичай, впливають на орієнтаційний порядок та коливальний рух різних частин фосфоліпідних молекул в протилежному напрямку, хоча це не було ні яким чином точно встановлено, навіть для простих модельних систем. Зміни у фазовому стані ліпідів мембран, суттєво впливають на орієнтаційний порядок і швидкості коливань [64].

Вплив складу головок фосфоліпідів на мембранну проникність є менш ясною. Раніше вважали, що в присутності кислих (негативно заряджених) фосфоліпідів треба очікувати збільшення мембранної проникності до аніонів і зменшення для катіонів внаслідок дії поверхневого потенціалу. Але це не завжди так. Наприклад, фосфатидилінозитол (PI) та фосфатидна кислота (PA) можуть зменшувати потік Cl^- та збільшувати потік K^+ в MLV-системах, тоді як фосфатидилсерін (PS) має малий вплив. Включення PA в насичені фосфатидилхолінові (PC) MLV зменшують катіонну проникність, тоді як в LUV EPC системах PA збільшує H^+ проникність. На даний момент немає простих підстав для передбачення впливу заряджених груп головок на властивості проникності бішару. Зміна проникності може бути, зокрема,

пов'язана зі збільшенням площі на молекулу заряджених різновидів фосфоліпідів внаслідок електростатичного відштовхування між головками, що, в свою чергу, спричинить збільшення безпорядку в ацильних ланцюгах [53].

Докази впливу ліпід-білкових взаємодій або складу анулярних ліпідів на локальну текучість не є строгими. Проте, ліпід-білкові взаємодії повинні задовольняти іншим очевидним вимогам, які спричиняє включення (запечаткування) білків у ліпідний матрикс. В роботі [65] припущено, що ліпіди повинні мати різноманітні "форми", які відповідають нерегулярному контуру білково-ліпідної гідрофобної поверхні. Це узгоджується з тим, що реконструкція інтегрального білка в рідинно-крісталічну фазу ліпиду лише одного виду часто приводить до підвищення проникності модифікованої білком мембрани до заряджених та нейтральних речовин [66,67]. Навпаки, при застосуванні гетерогенної суміші ліпідів, спостерігається набагато менша проникність. Глікофорін, наприклад, призводить до зростання проникності системи до молекул з молекулярною масою 900 або менше при включенні в 18:1_c/18:1_c PC (DOPC), що не спостерігається, коли глікофорін реконструюють в загальні ліпіди еритроцитів, або в суміш DOPC-DOPE [68]. Ці результати свідчать на користь припущення, що інтегральні білки потребують наявності в мембрані ліпідів різної форми, щоб забезпечити оптимальну упаковку і запечаткування на ліпід-білковій поверхні. При конформаційних переходах мембранних білків, викликаних тими чи іншими зовнішніми чинниками, оптимальна упаковка може зруйнуватись, що викличе збільшення проникності ліпідної фази поблизу таких білків.

Співвідношення між пасивною проникністю природних мембран до неелектролітів і складом ліпідів найбільш систематично було вивчено на прокаріоті *A.Laidlawii* В в серії робіт McElhaney et al [69-73]. Варіювали склад жирних кислот та вмісту холестерину в плазматичній мембрані і вивчали швидкості пасивної дифузії низки неелектролітів в інтактні клітини та з клітин, а також в ліпосоми, виготовлені із загальних ліпідів мембран, та з

них в залежності від температури. Зміна складу мембранних жирних кислот або рівня холестерину не змінювало якісний або кількісний розподіл мембранних білків і мало тільки помірний вплив на розподіл полярних груп головок ліпідів [64]. Завдяки цьому стало можливим селективне вивчення впливу варіації природи гідрофобної серцевини плазматичної мембрани цих організмів на властивості їх пасивної проникності. Проникність до неелектролітів інтактних клітин та ліпосом з них виявилась суттєво залежною від хімічної структури і довжини жирних кислот мембранних ліпідів. Біосинтетичне включення розгалужених або ненасичених жирних кислот, або жирних кислот зі зниженою довжиною ланцюгів, в мембрану збільшувало проникність до неелектролітів в однаковій мірі як для клітин, так і для ліпосом. Проникність як плазматичних, так і ліпосомальних мембран вище температур їх фазового переходу також знижувалась при включенні холестерину. Величина середньої енергії активації процесу переносу деяких неелектролітів в інтактні клітини і в ліпосоми, була однаковою в межах експериментальної похибки і не залежала від складу жирних кислот та вмісту холестерину в мембрані. Вона становила для гліцерину $18,2 \pm 0,9$ для клітин та $18,1 \pm 1,1$ для ліпосом, а для еритритолу - $21,3 \pm 0,7$ та $21,5 \pm 1,1$ кКал/Моль. Величина середньої енергії активації залежала від структури молекули таким чином, що можна було припустити, що більшість неелектролітів проникають як крізь природну, так і крізь штучну мембрану у вигляді поодинокі, повністю дегідратованої молекули. Пасивні проникності низки мембран з різним складом жирних кислот мали обернену залежність від температур фазового переходу ліпідів мембрани "гель-рідинний кристал" Це свідчить про те, що швидкості проникання збільшуються при збільшенні рідинності мембранних ліпідів. Схожі результати про залежність від стану ліпідів пасивної проникності для гліцерину в *E.Coli* були надані в роботі Eze and McElhaney [74].

Встановлено, що малі зміни в хімічній структурі стеролової молекули в мембрані *A.Laidlawii* В можуть значно змінити пасивну проникність

інтактних клітин через зміну фізичного стану мембранних ліпідів. De Kruijff et al.[72] показали, що присутність холестерину зменшує рухливість вуглеводневих ланцюгів мембранних ліпідів і збільшує щільність пакування ліпідних бішарів, таким чином знижуючи проникність для неелектролітів як клітин, так і ліпосом. Включення епіхолестерину, (3 α -гідрокси-ізомер), не має видимого впливу на текучість, або пакування ліпідів, і пасивну проникність модельних або біологічних мембран. З іншого боку, присутність кето-аналогу холестерину, який суттєво збільшує текучість мембранних ліпідів і приводить до більш вільного пакування бішарової структури, збільшує також і проникність до неелектролітів як клітин, так і ліпосом. Це дослідження підтверджує, що фізичні властивості мембранних ліпідів, які визначаються в першу чергу складом їх жирних кислот та вмістом стеринів, визначають властивості пасивної проникності до неелектролітів плазматичних мембран *A.Laidlawii*.

Проникність до неелектролітів плазматичних мембран *A.Laidlawii* та *E.Coli* виявилась дуже низькою, коли їх мембранні ліпіди існують цілком в гелітовому стані [72]. Проте, при температурах поблизу або трохи нижчих температури фазового переходу з гелітового до рідинно-кристалічного стану, ці мембрани стають цілком проникні до неелектролітів [64,72]. Схоже локальне збільшення пасивної проникності поблизу температури фазового переходу було одержано для низки модельних мембран, що складались з одного фосфоліпиду або бінарної суміші фосфоліпідів. Таким чином, цей ефект виявився універсальною властивістю ліпідних бішарів. Вважається, що структурні дефекти в молекулярному пакуванні на границі доменів з рідкою та твердою ліпідними фазами, збільшене латеральне стискання, або підвищена величина структурних флуктуацій поблизу температури фазового переходу ліпідів є відповідальними за цю властивість.

В роботі [75] визначали проникність еритроцитарних мембран до гліцерину та еритритолу за виходом ¹⁴C-мічених сполук. На підставі численних критеріїв автори вважали, що в еритроцити бика та свині

гідрофільні поліоли, як і ліпофільні органічні кислоти, проникають за механізмом простої дифузії крізь ліпіди мембрани. Показано, що навантажені холестерином мембрани еритроцитів демонструють невелике, але визначене зменшення проникності в залежності від вмісту холестерину. При вмісті холестерину приблизно в 1,6 разів більше, ніж в контролі, проникність зменшується на 10-20%. Це трохи менше, ніж було встановлено раніше для еритритолу для навантажених холестерином еритроцитів морської свинки. Результати роботи [75] показали, що збільшення вмісту холестерину в області низьких величин співвідношення холестерин/фосфоліпід (<1) сильно зменшує проникність мембрани еритроцита до неелектролітів. Максимальний ефект отримано при співвідношенні біля 0,6, тобто при 37 моль% холестерину. При подальшому збільшенні вмісту холестерину проникність продовжує зменшуватись, але не так сильно.

В роботі [76] показано, що видалення 35% мембранного холестерину з еритроцитів свині не викликає помітних змін аніонної та неелектролітної проникності. Але видалення більшої кількості холестерину призводить до різко вираженого збільшення проникності до еритритолу та ацетату. Швидкості проникання суттєво збільшуються при збільшенні ступеня видалення холестерину. При видаленні 55% холестерину величини проникності збільшуються майже вдвічі. Таке ж збільшення проникності одержали і для гліцерину. Більше того, збіднення за холестерином еритроцитів людини та бика також викликає збільшення "не полегшеного" транспорту неелектролітів. Ці результати надають прямі докази того, що холестерин в мембранах еритроцитів ссавців знижує пасивну проникність досліджених речовин і вказує на їх проникання крізь ліпідну частину мембрани.

Зрозуміло з простих фізичних міркувань та показано експериментально [57,77], що пасивна проникність ліпідних мембран до неелектролітів (P_d) прямо пропорційна коефіцієнту розподілу речовини (K_p) між ліпідною фазою та водою та коефіцієнту дифузії в ліпідній фазі (D). Найбільш суттєво

проникність залежить від ліпофільності неелектроліта. В експериментах на BLM з різним ліпідним складом показано [57], що при переході від 1,6-гександіола до мочевины P_d і K_p зменшуються на два порядки, тоді як коефіцієнт дифузії змінюється лише в 2,5 рази. Показано, що значення коефіцієнта проникності для будь якого з досліджених неелектролітів суттєво залежить від ліпідного складу мембрани, але приблизно однаково для всіх речовин. Так, для води значення P_d у випадку BLM з фосфатидилхоліну в 25 разів вище, ніж для BLM зі сфінгомієліну з холестеринном [57,78]. В роботі [79] було показано, що проникність мембрани клітин *Chara ceratophylla* до низки речовин прямо пропорційно залежить від коефіцієнта розподілу між оливковою олією та водою, що свідчить про їх проникання крізь ліпідний бішар. Але, в той же час, малі гідрофільні молекули, такі як мочевина, етиленгліколь і, насамперед, вода, легко проникають крізь мембрани окремих клітин. Молекули води виявляють аномально високу проникність і крізь ліпідні бішари.

На підставі аналізу цих експериментальних даних були створені моделі проникності, які пояснюють проникання гідрофільних молекул крізь біологічні мембрани. Один з варіантів таких моделей базується на уявленні про флуктуаційне утворення гідрофільних пор в ліпідному бішарі внаслідок теплового руху молекул. Теоретичний аналіз процесу флуктуаційного утворення пор в ліпідних бішарах [80] показав, що найбільш імовірним є утворення пор з діаметром 5-6 Å, а найбільший діаметр таких пор може досягати 10 Å. Аналіз стабільності BLM [81] показав, що критичний радіус пори, при якому мембрана з фосфатидилхоліну втрачає стабільність становить 9 нм (90 Å) для рідинно-кристалічного стану, та 2 нм (20 Å) для гелевого стану. Величина критичної пори для BLM в рідинно-кристалічному стані є настільки великою, що ймовірність механічного розриву мембран у фізіологічних умовах дуже мала. Розрив мембрани є можливим лише тоді, коли пора набуває розмірів, зрівнюваних з товщиною мембрани. Реальні пори у всіх випадках є набагато меншими, ніж критичні.

Але їх розміри можуть бути цілком достатніми для проникання малих гідрофільних молекул. З точки зору проникності ліпідні пори принципово відрізняються від білкових каналів своїм походженням і виключною динамічністю. В той час, як білкові канали мають визначені розміри, що зберігаються впродовж всього життя клітини, розміри ліпідних пор в процесі затікання варіюють в широких межах. В роботі [82] вивчали проникність ліпосом з фосфатидної кислоти в температурній області фазового переходу ліпиду з рідинно-кристалічного стану в гелювий. Проникність ліпідного бішару для води вивчали в дослідях з важкою водою, проникність для іонів води - методом рН-стрибка. Показано, що проникність для води при температурах, вищих за температуру фазового переходу, є на 9 порядків більшою ($2,4 \times 10^{-3}$), ніж для гідратованих іонів Na^+ (10^{-12}). Це свідчить про те, що розміри ліпідних пор є недостатніми для проходження гідратованих іонів, але достатні для проходження молекул води. Фазовий перехід мембранних ліпідів в гелювий стан супроводжується стрибкоподібним зменшенням коефіцієнта проникності для молекул води. Коефіцієнти проникності для іонів води мають той же порядок, що і для води як до так і після фазового переходу. Автори вважають, що це дає підстави припустити, що молекули і йони води перетинають ліпідну мембрану одним і тим же шляхом. Це приводить авторів робіт [81,82] до відомої гіпотези про те, що ліпідний бішар насичений дефектами на кшталт трансмембранних ланцюгів молекул структурованої води. Молекули води зв'язані між собою водневими зв'язками. Припускається, що протони можуть пересуватись по системі міжмолекулярних водневих зв'язків.

Інша модифікація гіпотези ліпофільного сита зводиться до припущення наявності в мембранах постійно існуючих гідрофільних пор певного розміру, крізь які проникають невеликі розчинені у воді речовини. Ще в 1957 році Paganelli, Solomon [3] показали, що осмотична та дифузійна проникність еритроцитів людини для води не є однаковими, і припустили, що їх мембрани пронизуються еквівалентними порами радіусом $3,5 \text{ \AA}$. Радіус пор

був оцінений з відношення коефіцієнтів осмотичної (P_f) та дифузійної (P_d) проникності. Згодом в [23] виміряли коефіцієнт відбиття мембран еритроцитів людини для низки малих гідрофільних речовин і визначили, що вони відповідають очікуванню для водних пор, розміри яких розраховували на підставі рівнянь, що описують проходження речовин крізь капілярні та пористі целюлозні мембрани [24]. Виходячи в першу чергу з цих результатів, а також з отриманого відношення $P_f/P_d=3,4$, Solomon [24] прийшов до висновку що мембрани еритроцитів можна характеризувати еквівалентними порами з радіусом 4.2-4,6 Å. В 90-их роках він оцінював розмір пор вже в 6,5 Å [26,27]. Для BLM, в яких білкові канали відсутні, було показано [24], що відношення осмотичного та дифузійного потоків дорівнює одиниці. На думку Solomon [24] це надає додаткові докази на користь того, що відношення $P_f/P_d>1$ свідчить про існування водних каналів. Це було підтверджено роботами, в яких досліджували проникність ліпідних бішарів [83] та ліпосом [84], модифікованих антибіотиками, до води та малих неелектролітів. В роботі [83] було показано, що канали, індуковані антибіотиками, нистатином та амфотерицином В, характеризуються відношенням $P_f/P_d=3,3$, тобто фактично таким же, як і в еритроцитах. До того ж, стеричні обмеження, що створюють ці індуковані антибіотиками канали, точно описуються рівняннями для проходження крізь капіляри і не відрізняються від таких для еритроцитів людини [84,85]. В роботі [84] було показано, що проникність до води та малих неелектролітів ліпосом, виготовлених з різних сумішей фосфоліпідів та холестерину, різко збільшується при модифікації ліпідних мембран нистатином, або граміцидіном А. Збільшення проникності залежить від виду проникаючих молекул і є набагато більшим для речовин з найменшим коефіцієнтом розподілу між оливковою олією та водою і зменшується при збільшенні розмірів молекул, особливо для розгалужених молекул.

Наступним аргументом на користь концепції водних пор було визначення видимої енергії активації для дифузії води в еритроцити людини

[86], яка становила 6 кКал/Моль. Ця величина є трохи більшою, ніж для дифузії води в об'ємному розчині (4,5 кКал/Моль), але меншою, ніж для не модифікованих антибіотиками ліпідних мембран (11-14 кКал/Моль) [54]. Для еритроцитів собаки ці ж автори [54] знайшли енергію активації дифузії води рівною 4,5 кКал/Моль, тобто рівною енергії активації дифузії в об'ємному розчині. Вони пояснили це більшим розміром еквівалентних пор в еритроцитах собаки.

Щоб отримати конкретні докази існування водних білкових каналів необхідні були методи маніпуляції з ними. В роботі [87] було показано, що хоча водна проникність не чутлива до багатьох транспортних реагентів, вона дуже сильно але оборотно пригнічується ртутним сульфгідрильним реагентами пара-хлоромеркурійбензен сульфонатом (p-chloromercuribenzenesulfonat - pCMBS), хлормеродріном та мерсалілом. При обробці еритроцитів pCMBS в насичуючих дозах (≥ 2 мМ), більшість ознак існування каналів зникає [88]. Зокрема, pCMBS зменшує P_f на порядок, а дифузійну проникність P_d приблизно на 50%, знижуючи відношення P_f/P_d до одиниці та збільшуючи енергію активації від 4,8 до 11,5 кКал/Моль. Таким чином, властивості водного транспорту в оброблених pCMBS еритроцитах практично не відрізняються від властивостей ліпідних бішарів. Вони зробили висновок, що ртутні реагенти взаємодіють з сульфгідрильними групами білків, пов'язаних з водними каналами, що приводить до закриття цих каналів. Цей погляд був також додатково підтриманий результатами порівняння з даними для еритроцитів курчат [89], які, очевидно, не мають білкових водних каналів, оскільки для них $P_f/P_d=1$, а енергія активація проникання води становить 11,4 кКал/Моль. Крім того, pCMBS не впливає на транспорт води в еритроцитах курчат. Це також свідчить про те, що pCMBS не впливає на транспортні характеристики ліпідного бішару.

Sha'afi et al [90] провели порівняльне дослідження впливу сульфгідрильних реагентів на водний транспорт. Вони використовували ^{14}C -мічений 5,5'dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) і показали, що він

зв'язується з сульфгідрильними групами мембранних білків і також пригнічує транспорт води. Методом розділення білків в поліакріламідному гелі було показано, що майже весь ^{14}C -DTNB мігрує з інтегральним білком еритроцитарної мембрани, відомим як смуга 3. Також було досліджено зв'язування рСМВ з еритроцитами і виявлено, що цей, також ефективний, інгібітор потоків води в еритроцитах, зв'язується переважно з білком смуги 3. На підставі вивчення дії сульфгідрильних реагентів Brown et al [91] припустив, що смуга 3 є локусом водних каналів еритроцитів. В роботах [24,92] також було підтверджено, що рСМBS так само зв'язується переважно з білком смуги 3. Ці автори припустили, що цей білок є локусом не тільки транспортних шляхів води і мочевины, але і аніонного обміну.

Білок смуги 3 є основним інтегральним білком еритроцитарної мембрани за стандартною класифікацією Fairbanks, з молекулярною масою 95 кДа [93]. В мембрані еритроцита знаходиться приблизно 1 млн молекул на клітину, він складає біля половини всіх інтегральних білків [93,94]. Дитетрамерні асоціати білка смуги 3 формують канал аніонного транспорту в мембрані еритроцита [95]. Методами електронної мікроскопії і тривимірної реконструкції зображення була виявлена U-подібна структура цього мембранного обмінника з розмірами 60 та 110 Å і товщиною 80 Å. Глікопротеїн, утворений 911 амінокислотами, включає 52 кДа гідрофобний домен (С-термінал), який здійснює аніонний транспорт, і N-термінал цитозольного домена (43 кДа). Білок смуги 3 здійснює перенесення аніонів крізь еритроцитарну мембрану. Гідрофільний N-термінал білка смуги 3 асоційований з гліколітичними ферментами [96], він є одним з основних організуючих центрів еритроцитарної мембрани. З цитозольним доменом білка смуги 3 пов'язані такі периферичні білкові ліганди, як анкірін (головний місток спектрин-актинового скелету), білок смуги 4.1, білок смуги 4.2, альдолаза, гліцеральдегід-3фосфат дегідрогеназа, фосфофруктокіназа, диоксигемоглобін і геміхроми [97]. Рухливість інтегральних білків обмежена

обертовою рухливістю, оскільки взаємодія цих структур з компонентами цитоскелету виключає суттєве латеральне переміщення.

На противагу припущенням Solomon, Masey [98] показав, що кінетика пригнічення транспорту мочевины має набагато більшу швидкість порівняно з кінетикою пригнічення транспорту води. Тому він припустив, що молекули води та мочевины транспортуються різними шляхами. Виходячи з того, що концентрації pCMBS, достатні для блокування більшості водних каналів, викликають збільшення витоку катіонів принаймні на порядок [92,99], не впливаючи як на електрогенний, так і обмінний, аніонний транспорт [100] Масеу приходить до висновку, що іони та вода не можуть транспортуватись спільними каналами. Він також вважає, що дані про пригнічення транспорту мочевины низкою інгібіторів, які не впливають на транспорт води, наприклад флоретін, свідчать про незалежність шляхів транспортування мочевины та води. Крім того, автор наводить докази існування механізму полегшеної дифузії мочевины крізь мембрани еритроцитів людини.

В роботі [92] вивчали кінетику зв'язування pCMBS з еритроцитарною мембраною, використовуючи ^{203}Hg -pCMBS. Було підтверджено зв'язування pCMBS з білком смуги 3, причому стехіометрія процесу така, що на чотири молекули білка смуги 3 припадає один сайт пригнічення транспорту мочевины та три сайти транспорту води. Автори також зазначають, що хоча процес аніонного обміну еритроцитів вивчений дуже детально, все ще немає згоди у питанні, чи аніонообмінний канал проходить крізь мономер, як вважають Falke and Chan [101], чи аніон рухається між двома мономерами, нековалентно зв'язаними у димер за версією Jay, Cantley [95]. Ясно, що взаємодія інгібітора з одним мономером може впливати на конформацію другого мономера. Є також підстави вважати, що білок смуги 3 існує в мембрані у вигляді тетрамера [95,102]. Що стосується водних каналів, то також немає консенсусу з питання, чи вони проходять між двома мономерами смуги 3, як запропонував Solomon et al [24]. Автори вважають, що запропонована ними тетрамерна модель забезпечує найкраще пояснення

процесів пригнічення транспорту води та мочевины, які залежать від чотирьох молекул смуги 3, що діють узгоджено. Різниця ж кінетичних характеристик пригнічення транспорту води та мочевины пов'язана з різною доступністю цих сайтів на початку процесу.

Автори [24] зазначають, що сульфгідрильні реагенти блокують водні канали, не закриваючи їх, наче пробка закорковує пляшку, а викликаючи конформаційні зміни білка смуги 3, з яким вони зв'язуються хімічно. Це може, зокрема, пояснити підвищення витоку катіонів при дії pCMBS, оскільки, як зазначалось вище, конформаційні зміни в інтегральних білках можуть привести до нещільності пакування прилеглих ліпідів. В цьому разі аргумент Масау про те, що той факт, що витік катіонів підвищується, тоді як транспорт води пригнічується, суперечить моделі Solomon, спростовується, якщо, звичайно, не наполягати на тому, що витік катіонів здійснюється саме крізь канал.

Solomon [24] вважає, що транспорт неелектролітів, який спостерігається після дії сульфгідрильного реагенту, здійснюється не крізь ліпідну фазу, як припускає Масау [102], оскільки він є набагато більшим, ніж визначений для ліпідних везикул, а крізь ті ж конформаційно змінені канали. Збільшення енергії активації процесу проникання в цьому разі він пояснює взаємодією проникаючих молекул зі стінками звуженої водної пори. Для підтвердження цієї думки він посиляється на результати роботи [103], в якій показано, що видима енергія активації дифузії води в пористих мембранах з величиною $P_f/P_d=3,2$ не дуже відрізняється від такої для мембран нативних еритроцитів і становить 8,1 кКал/Моль. Крім того, Solomon вважає, що проникність мочевины після дії pCMBS залишається все ще набагато більшою, ніж для ліпідних бішарів [57], і не може бути віднесена до проникання крізь ліпідну фазу.

Той факт, що флоретін пригнічує транспорт мочевины, не впливаючи на транспорт молекул води, автори роботи [24] пояснюють тим, що флоретін здійснює свій вплив опосередковано через мембранні ліпіди. Показано [104],

що пригнічуючий вплив флоретину на проникність низки неелектролітів є обернено пропорційним до коефіцієнту розподілу цих речовин, який залежить від здатності молекул утворювати водневі зв'язки. Автори вважають, що це вказує на те, що флоретін впливає на стан зовнішньої частини пори, в якій здійснюється обмін водневих зв'язків проникаючої речовини з водою на водневі зв'язки зі стінками пори (так званий Н-зв'язуючий регіон).

Молекулярна модель водної пори, запропонована Solomon [24] сконструйована з елементів білка смуги 3, що мають відношення до транспорту крізь мембрану, а саме 15 кДа мембранно-транспортного фрагменту та 8 кДа мембранної петлі за Ramjeesingh et al [105,106]. Ці сегменти мембранного білка, що проходять крізь мембрану мають високий вміст α -спіральних ділянок. При побудові моделі мембранної пори автори виходили з того, що (1) водні пори локалізовані між двома мономерами в димерній структурі; (2) мембранотранспортний ансамбль складається з низки α -спіральних ділянок, які в кожному мономері непарну кількість разів перетинають мембрану; (3) Гідрофільні залишки α -спірального ансамблю контактують з водним каналом, а гідрофобні залишки стабілізують ансамбль, контактуючи з мембранними ліпідами. З'єднуючись у димер певним чином, ці мономерні ансамблі утворюють водну пору, яка на думку Solomon має радіус 4,5 Å.

В роботі [26] набуває подальшого розвитку модель водної пори, яка представляє собою еквівалентну пору радіусом 6,5 Å з областями обміну водневими зв'язками на вході і виході, де відбувається обмін водневих зв'язків проникаючої молекули з водою на водневі зв'язки з каналом. Взаємодія молекул з порою в цих областях залежить від конфігурації цих молекул і характеризується константою дисоціації. Область між Н-обмінними регіонами - власне пора, проходження крізь яку контролюється стеричними перешкодами, автори називають "областю специфічного сита". Пригнічення транспорту води та інших молекул може спричинюватись або

більшими стеричними обмеженнями при проходженні крізь область "специфічного сита", або додатковим зовнішнім бар'єром в області Н-зв'язків при вході/виході в канал. Автори припускають, що місця зв'язування води та неелектролітів розташовані неоднаково в Н-обмінному регіоні. Можна відрізнити зміни характеристик каналу, спричинені змінами в різних областях. Будь які впливи, які зменшують розміри каналу в області "специфічного сита", повинні впливати як на дифузійну, так і на осмотичну проникність води. Але вплив на дифузійну проникність, яка залежить від квадрату радіуса каналу, буде меншим, ніж на осмотичну, яка залежить від четвертого ступеню радіуса каналу. Той факт, що пригнічення водного транспорту викликає суттєві зміни дифузійної проникності приводять авторів до висновку, що зміни відбуваються в Н-зв'язуючому регіоні і не пов'язані з розмірами каналу. Автори вважають, що сайти зв'язування мочевины та етиленгліколю знаходяться в областях набагато менш полярних, ніж вода, тобто близько до неполярних залишків білка або прилеглих ліпідів.

Масеу [98] погоджується з думкою Solomon, що білок смуги 3 є найбільш імовірним претендентом на створення водних каналів, але вважає його модель сумнівною. Він розглядає водні канали, як дуже специфічні структури, які транспортують тільки воду і можуть навіть не утворювати континуум в загальноприйнятому сенсі. Розчинені ж речовини, на думку автора, мають свої транспортні шляхи. Масеу зазначає, що інтерпретація Solomon, яка полягає в тому, що P_f/P_d при обробці еритроцитів рСМBS знижується до 1 через посилення взаємодії зі стінками пори у звужених після конформаційних змін білка порах, є некоректною. Некоректність полягає в тому, що показано, як теоретично, так і експериментально, що при звуженні каналів до досягнення однорядної дифузії, відношення P_f/P_d не стає рівним одиниці, а дорівнює числу молекул в каналі [9,107]. До того ж, той факт, що DIDS пригнічує аніонобмінний процес, але не впливає на проникність до води та мочевины, і навпаки, рСМBS не впливає на обмін аніонів, пригнічуючи проникність до води та неелектролітів, свідчить про реалізацію

цих процесів окремими структурами. Але це не означає, на думку автора, що різні локуси тієї ж самої мембранної макромолекули не можуть бути залучені в управління більш ніж одної "незалежної" транспортної системи.

В роботі [11] вивчали дифузійну проникність еритроцитів собаки до води, гідрофільних (мочевина, ацетамід) та гідрофобних (метанол, етанол, антипирін) речовин після впливу інгібіторів транспорту (DTNB, pCMBS, флоретину та тіомочевини). Показано, що 2мМ pCMBS пригнічує дифузійний транспорт води на 60%. При обробці еритроцитів pCMBS з цією концентрацією спостерігається також значне зменшення проникності для ацетаміду (в 2 рази) та менш значне для мочевины (на 25%). Проникність трьох ліпофільних сполук вірогідно не змінювалась. DTNB не змінював дифузійну проникність для води і трохи підвищував її для ацетаміду та мочевины. Але це підвищення було не вірогідним. Тіомочевина, конкурентний інгібітор транспорту мочевины, не змінював дифузійну проникність еритроцитів собаки для води. Проникність для ацетаміду та мочевины зменшувалась на 30% та 60% відповідно. Проникність для ліпофільних сполук не змінювалась. Флоретін, як уже зазначалось, впливає на стан анулярних ліпідів і не має вірогідного впливу на осмотичну проникність мембран еритроцитів. В роботі [11] показано, що флоретін не впливав на дифузійну проникність мембран еритроцитів собаки для води, але значно зменшував проникність ацетаміду (на 27%) та мочевины (на 44%). Проникність до метанолу збільшувалась, але не вірогідно.

Таким чином, результати [11] показали, що транспортні інгібітори, які взаємодіють з білками (pCMBS, DTNB) та фосфоліпідами (флоретін) еритроцитарних мембран, зменшують дифузійну проникність гідрофільних неелектролітів, але не мають значного впливу на проникність ліпофільних електронейтральних сполук. Всередині групи гідрофільних неелектролітів вплив інгібіторів відрізнявся для кожної речовини. Автори вважають, що малі ліпофільні речовини, такі як метанол та етанол, проникають крізь мембрану шляхом, відмінним від шляхів проникання малих гідрофільних

неелектролітів, оскільки ніякі білкові реагенти, які зменшують проникність малих гідрофільних речовин, не впливають на проникність ліпофільних. Цікаво, що флоретін, який взаємодіє зі специфічними мембранними фосфоліпідами в ліпосомах [108] і фосфоліпідами, асоційованими з білком в еритроцитах [109], також не впливає на дифузійну проникність малих ліпофільних сполук. Але показано, що флоретін збільшує проникність більших за метанол чи етанол ліпофільних молекул.

Порівняння даних про дифузійну проникність, температурні залежності та вплив інгібіторів вказує на те, що такі ліпофільні сполуки, як метанол та етанол, проникають шляхом дифузії крізь ліпідний матрикс. Таким чином, вся клітинна поверхня визначає бар'єр для ліпофільних сполук, проникність яких не змінюється під дією інгібіторів проникання гідрофільних речовин. Великий розмір антипірину пояснює його низький дифузійний коефіцієнт проникності і більшу енергію активації, визначену в роботі [11].

Моделі пригнічення проникання гідрофільних неелектролітів є більш складними. Дифузійна проникність тритієвої води знижується під дією рСМBS, але не змінюється під впливом DTNB, тіомочевини або флоретину. В еритроцитах людини рСМBS пригнічує як осмотичний, так і дифузійний потоки води при 20 та 37°C. Енергія активації між цими двома температурами для дифузійної проникності за даними роботи [42] для контрольних еритроцитів становить 6,8 кКал/Моль, а для рСМBS-оброблених клітин - 9,7 кКал/Моль. За нашими даними, отриманими тим же методом [46], енергія активації дифузії води крізь мембрани еритроцитів людини в області температур 37-12°C становить 4,2 кКал/Моль (17,5 кДж/Моль), а в низькотемпературній області (12-0°C), де, як ми вважаємо, дифузія відбувається ліпідним шляхом, вона становить 10,7 кКал/Моль (44,8 кДж/Моль). В еритроцитах собаки E_a для дифузійного проникання води становить 5,3 кКал/Моль в нативних клітинах та 6,2 кКал/Моль в рСМBS-оброблених. Різниця у прониканні води в еритроцитах собаки та людини обговорюється в [86]. В еритроцитах людини рСМBS, як вже зазначалось,

зв'язується переважно з білком смуги 3, тоді як в еритроцитах собаки зі смугою 4,9 і меншою мірою зі смугами 5 і 7. Як в еритроцитах людини, так і собаки, дифузійний транспорт при 2 мМ рСМBS становить 50-60% від контрольної величини. Осмотична ж проникність для води в еритроцитах людини зменшується до 10% від контролю [5,6], тобто 90% осмотичного потоку здійснюється крізь білкові пори, з якими зв'язується рСМBS, а 10% крізь ліпіди [102,110], або інші нечутливі до дії рСМBS білкові структури. Якщо взяти величини коефіцієнтів осмотичної P_f та дифузійної P_d проникності еритроцитів людини [24] $1,73 \times 10^{-3}$ і $5,3 \times 10^{-3}$ см/с відповідно при 20°C, то 90% зменшення P_f та 60 % зменшення P_d дає ту ж саму величину $2,0 \times 10^{-3}$ см/с для коефіцієнта проникності для води еритроцитів, оброблених рСМBS. Це вказує на те, що трансмембранне перенесення води відбувається двома шляхами. Схожі оцінки та висновки були зроблені Brahm [111] щодо проникності еритроцитів для води при 25°C. Таким чином, як в еритроцитах людини, так і в еритроцитах собаки, рух молекул води здійснюється принаймні двома незалежними шляхами. Автори [11] також вважають, що отримані ними дані не дають можливості визначити, білковими чи ліпідними шляхами здійснюється проникання води, що не пригнічується рСМBS. Різний вплив інгібіторів на проникність для води та неелектролітів вказує, на думку авторів, або на різні шляхи їх проникання, або на різну чутливість спільного шляху для проникання різних речовин.

Мочевина та ацетамід відрізняються за структурою наявністю метильної групи в ацетаміді та аміногрупи в мочевині. Вони мають майже однакову молекулярну масу, тоді як молярний об'єм мочевини майже на третину менший, а коефіцієнт розподілу в системі "оливкова олія-вода" для мочевини в два рази менше, ніж для ацетаміду. Мочевина проникає в еритроцити собаки десь в три рази швидше, ніж ацетамід. Енергія активації для проникання мочевини становить 8,1 кКал/Моль, тоді як для ацетаміду вона становить 12 кКал/Моль [11]. Схожі співвідношення для еритроцитів людини при 20°C приводять авторів [112] до висновку, що мочевина

проникає в еритроцити за механізмом полегшеної дифузії. Автори ж роботи [11] вважають, що отримані результати не дають можливості зробити висновок про полегшену дифузію для мочевины. Результати показують, що ацетамід і мочевины мають, принаймні частково, спільні шляхи проникання, які однаково пригнічуються тіомочевиною. В той же час автори припускають наявність інших різних для цих двох речовин шляхів проникання, які різною мірою пригнічуються рСМBS.

Нового поштовху набули дослідження проникності для води та неелектролітів після розробки методів клонування (тиражування) білків, виділених з тих чи інших мембран. Так, в 1992 році був відкритий 28 кДа білок [113], так званий CHIP28 (channel-forming integral membrane protein), виділений з мембран еритроцитів. Було показано [114-116], що цей білок виконує роль водотransпортних каналів і щільно зв'язаний всередині мембрани еритроцита. Виявилось, що здатність мембран транспортувати воду спричинює клас білків зі структурою, подібною до структури CHIP28, такі як білок бичачого кришталика MIP26, відомий як аквапорин. CHIP28 існує в мембрані еритроцита у вигляді тетрамера. Відомі мономери, що здатні транспортувати воду, наприклад 30 кДа білок в мембранах еритроцитів кролика [117]. Для функціонування білка CHIP28 не потрібні спеціалізовані ліпіди. Він здійснює водотransпортні функції при вбудовуванні в мембрани клітин різного походження. Було виявлено окрему групу індивідуумів, у яких бракувало нормального CHIP28 в їх еритроцитарних мембранах [118]. Проникність для води в еритроцитах цих індивідуумів була пригнічена до 20% від проникності нормальних клітин, що близько до величини 19,1% водного потоку крізь ліпідну фазу в нормі, отриманої Solomon [119]. Проникність для мочевины в таких еритроцитах не відрізнялась від контролю. Схожі спостереження були здійснені Mathai et al. [120], які вимірювали осмотичний та дифузійний коефіцієнти проникності еритроцитів з відсутнім CHIP28, отриманих від сім'ї донорів, що мали мутацію відповідного гена. Дифузійна проникність цих клітин для води становила

близько 35% від такої для нормальних еритроцитів. Проникність цих мутованих клітин до мочевины не визначали. Той факт, що суттєва частка водного транспорту не здійснюється білком CHIP28 означає, що повинен бути додатковий механізм, здатний здійснювати перенос води крізь еритроцитарну мембрану. Було оцінено кількість копій CHIP28, яка становить 2×10^5 копій на еритроцит за [114] та $3,2 \times 10^4$ копій на еритроцит за [121]. Важливо також, що CHIP28 не транспортує мочевины [122,123]

В роботі [124] повідомляється про виділення з нирки щура та клонування ще одного білка-аквапорина (AQP) сімейства MIP (major intrinsic protein). Виділений авторами AQP-MIP, який вони назвали аквапорин 3 (AQP3), при введенні в *Xenopus* ооцити збільшував осмотичну проникність для води (P_f) цих ооцитів в 10 разів, яка становила $(1,5-2) \times 10^{-2}$ см/с. Ця проникність оборотно пригнічувалась під дією 0,3мМ HgCl₂. Це вказує на залучення до транспорту води SH-груп. Енергію активації транспорту води модифікованих ооцитів визначали по виміряним значенням P_f при 10, 20 та 30°C. Вона становила 3,7 кКал/Моль, що відповідає енергії активації, очікуваній для водних каналів. Виділений транспортний білок AQP3 виявив здатність підвищувати проникність для гліцерину в 4 рази (23×10^{-6} см/с), порівняно з відомим на цей час GlpF (glycerol facilitator), який підвищує проникність *Xenopus* ооцитів в 5 разів. Енергія активації для проникання гліцерину у випадку AQP3 в діапазоні температур 4-24°C становить 6 кКал/Моль. Ця величина є більшою, ніж для вільної дифузії, але меншою, ніж для дифузії крізь ліпідні бішари (10-20 кКал/Моль). Для GlpF вбудованого в *E.coli* вона становила 5 кКал/Моль. AQP3 підвищував також проникність ооцитів для мочевины в 2 рази до значення $2,3 \times 10^{-6}$. Класичний інгібітор транспорту мочевины флоретін повністю пригнічував цю проникність. Несподівано виявилось, що флоретін, який зазвичай не впливає на транспорт води, пригнічував його на 58%. Для більших молекул, таких як амінокислоти та глюкоза транспорт AQP3-модифікованих клітин не змінювався. Отримані результати вказують на те, що AQP3 утворює в

мембранах клітин пори, крізь які можуть транспортуватись як молекули води, так і малих неелектролітів (таких як мочевина та гліцерин), але не пропускають молекули більшого розміру. Значення енергій активації також підтверджують каналний механізм транспорту при включенні AQP3 в мембрану.

Оскільки виявилось, що до транспорту води в еритроцитах людини причетний каналостворюючий білок CHIP28, який не транспортує малі гідрофільні молекули на кшталт мочевины, стало необхідним переглянути уявлення про те, що аніонобмінний білок смуги 3 причетний до проникання води та мочевины. В роботі [125] було проведено дослідження впливу низки інгібіторів аніонного транспорту класу бензен сульфонатів (BS), які є структурно подібними до класичного інгібітора аніонобмінного транспорту DIDS (4,4'-diisothiocyanate-2,2'stilbene disulfonate). Показано, що ці інгібітори пригнічують транспорт мочевины на 92% та стимулюють проникнення води на 58%. При цьому, кінетика пригнічення мочевины збігається з кінетикою пригнічення аніонного обміну, а BS конкурують з DIDS за сайти зв'язування. Показано, що потоки води та мочевины залежать від спільного "рушія", який пов'язаний з місцями зв'язування DIDS, відповідальними за вплив BS на потоки мочевины, води та аніонів. Часткова стимуляція потоку води лінійно корелює з пригніченням потоку мочевины. Результати роботи [125] ще раз підтвердили взаємозв'язок цих трьох видів транспорту з білком смуги 3. Можливо, на думку авторів, є окремі функціональні домени цього білка, чутливі до конформаційних перетворень один одного, але вони ніяк не пов'язані з CHIP28.

В своїй наступній роботі автори [7] знов повернулись до питання взаємозв'язку проникностей мембран еритроцитів людини для води і малих гідрофільних неелектролітів та мембранних структур, що відповідають за них. Ще раз були ретельно виміряні коефіцієнти відбиття для низки гідрофільних речовин за допомогою флюоресцентного зонда та отримані коригуючі поправки до них, які враховують існування паралельних шляхів

проникання речовин. Вони отримали коефіцієнти відбиття для мочевини та інших неелектролітів, що були суттєво меншими за 1. Виходячи з цього автори вважають, що версія ніби транспорт води пов'язаний лише з транспортним білком CHIP28, який не транспортує інші речовини, такі як мочевина, знаходиться у протиріччі з очевидними доказами взаємозв'язку між потоками розчинених речовин та розчинника. Цей взаємозв'язок також підтверджується кореляцією між цими потоками, а також дією інгібіторів аніонного транспорту класу бензенсульфонатів. Досліди з інгібіторами та значення величин коефіцієнтів відбиття, на думку авторів свідчать, що мочевина перетинає мембрану еритроцитів по водних каналах. В роботі [120] показано, що відношення осмотичної та дифузійної проникностей для води (P_f/P_d) еритроцитів з браком білка CHIP28 становить 3,3, що вказує на каналний механізм транспорту води. Ця величина є суттєвою часткою відношення $P_f/P_d=5,1$ для нормальних еритроцитів при 20°C [6]. Той факт, що залишається 20-35% потоку води в еритроцитах з браком CHIP28, узгоджується з існуванням в мембранах еритроцитів інших каналних білків.

Значна кількість свідчень підтримує точку зору, що характеристикою транспорту гідрофільних неелектролітів крізь низку клітинних мембран є дискримінація речовин за розмірами. Це підтверджується і даними роботи [7] щодо коефіцієнтів відбиття для мочевини та малих гідрофільних амідів, які лінійно залежать від молярного об'єму речовини. В роботах [26,27] було ретельно досліджено проникність мембран еритроцитів людини до неелектролітів низок діолів та амідів. Було показано, що логарифм коефіцієнтів проникності мочевини та амідів вірогідно ($P<0.01$) залежить від молярного об'єму речовини, що узгоджується з уявленням про дифузію крізь ситоспецифічний канал. Важливість діаметру молекул демонструється порівнянням 1,3-диметилмочевины ($D=5,24 \text{ \AA}$) з 1,1-диметилмочевиною ($D=5,64 \text{ \AA}$) і спостереженням, що громіздка конфігурація двох метильних груп в положенні 1,1 знижує ω від $2,4 \times 10^{-15}$ до $1,4 \times 10^{-15}$ Моль/дин·с.

Крім того, виявилось [126], що високі концентрації мочевини та інших коротколанцюгових гідрофільних амідів та метилзаміщених мочеви́н пригнічують транспорт води крізь еритроцитарні мембрани, амід ж, пригнічують також і транспорт мочеви́ни. Існує взаємозв'язок між пригніченням амідами транспорту мочеви́ни і води. Для етиленгліколю та інших алканолів також було показано пригнічення водної проникності з близьким значенням ефективної концентрації [26]. Автори цієї роботи дотримувались відомої думки, що існує два головних чинники, які визначають проходження малих гідрофільних молекул крізь еритроцитарні мембрани: розмір молекул та їх здатність утворювати водневі зв'язки; також є два термодинамічних параметра, що описують взаємодію розчиненої речовини з мембраною: σ та ω (коефіцієнт відбиття та коефіцієнт проникності). В роботі проведено систематичне дослідження зв'язку між цими молекулярними детермінантами та термодинамічними параметрами. Визначено, що для всіх досліджених алканолів коефіцієнт відбиття суттєво менший за одиницю. Хоча термодинамічні докази свідчать про те, що є зв'язок між потоками води і мочеви́ни, це не означає, що всі водні канали є також каналами для мочеви́ни. Але ясно, що множина каналів мочеви́ни повинна бути суттєвою фракцією загальної кількості водних каналів. Автори роботи [26] також виявили значну кореляцію між проникністю еритроцитів для води та проникністю їх для мочеви́ни або етиленгліколю при дії інгібітора BS^3 , що ще раз підтвердило їх припущення про спільні шляхи проникання цих неелектролітів та води.

Також були розраховані коефіцієнти тертя речовина/мембрана f_{sm} та речовина/розчинник f_{sw} за Kathalsky, Curran [127]

$$f(\sigma_i)=1-(\omega_i V_i/L_p)-\sigma_i= \omega_i(f_{sw}\Delta x/\phi_w)$$

де Δx - товщина мембрани , ϕ_w - фракційний вміст води в мембрані. Показано, що f_{sm} є домінантним чинником для молекул, розміри яких наближаються до розмірів еквівалентної пори, на відміну від дифузії речовин крізь великі пори, наприклад крізь діалізну мембрану, розміри пор якої є набагато

більшими від розмірів молекул. У випадку великої пори f_{sw} стає набагато більшою за f_{sm} і визначається, головним чином, дифузією. На думку авторів [26], результати щодо коефіцієнтів тертя та співвідношення між ними для різних молекул надали додаткові докази того, що малі гідрофільні прямоланцюгові алканоли проходять крізь еритроцитарну мембрану по водних каналах. Слід зауважити, що досліджені в цій роботі речовини, а саме етиленгліколь, 1,2-пропандіол, три ізомери бутандіолу, гліцерин (пропантріол) та бутантріол не можна однією купою відносити до гідрофільних, оскільки бутандіоли, порівняно з етиленгліколем, пропандіолом та гліцерином є відносно гідрофобними (або менш гідрофільними). З причини неврахування цього факту автори і вважають характеристики проникання 2,3-бутандіолу аномальними, порівняно з іншими дослідженими речовинами. Порівняння між різними алканами показало, що додавання однієї ОН-групи до кінцевого метилу збільшує f_{sm} в 8 разів і набагато менше (в 2 рази) при додаванні до внутрішньої метиленової групи. Це пов'язано з тим, що додавання ОН-групи має великий вплив на здатність утворювати водневі зв'язки і набагато менший на розмір молекул. Це порівняння показує, що здатність молекули утворювати водневі зв'язки є важливою детермінантою її проникання крізь мембрану. Менший вплив внутрішніх ОН-груп пояснюється більш сильними внутрішньомолекулярними водневими зв'язками поряд розташованих ОН-груп, що зменшує міцність водневих зв'язків із зовнішнім середовищем (водою або стінками пори). Ефект додавання CH_2OH -груп є більш вираженим, оскільки викликає як посилення водневих зв'язків, так і суттєве збільшення розмірів молекули, що спричинює значне збільшення f_{sm} .

В роботі [27] було зроблено спробу виявити вплив здатності молекул до Н-зв'язків на їх проникність крізь еритроцитарні мембрани на прикладі амідів аналогічно тому, як це було зроблено в попередній роботі [26] для діолів. Для цього були вибрані пари сполук: N-метилформахід - ацетамід та N-метилацетамід - пропіонамід. Члени кожної пари містять однакову

кількість CH_2 -груп, але відрізняються кількістю очікуваних Н-зв'язків. На жаль геометричні параметри цих молекул також відрізнялись, що не дозволило авторам зробити чітких висновків. Так, проникність ацетаміду зменшувалась порівняно з метилформамідом, але і діаметр молекули ацетаміду також більший за діаметр метилформаміду. В подальших спробах отримати інформацію про вплив здатності молекул до Н-зв'язків на проникність в низці амідів автори порівнювали проникність пари N-метилпропіонамід - N-етилацетамід, які мають по три метиленових групи, що на одну групу більше ніж в попередніх парах амідів. В зв'язку з цим, розчинність цих речовин в ліпідах є більшою. Це підтверджується також більшою енергією активації проникання цих речовин крізь мембрани еритроцитів. Так, видима енергія активації малих гідрофільних амідів становить 11-12 кКал/Моль. Додавання однієї CH_2 -групи в пропіонаміді збільшує видиму енергію активації до 19,3 кКал/Моль, а другої в бутираміді - до 26 кКал/Моль, що узгоджується з припущенням про проникання крізь ліпіди. Автори прийшли до висновку, що існування паралельних шляхів проникності ускладнює термодинамічний аналіз цього процесу і визначення коефіцієнту відбиття. В роботі [128] були отримані термодинамічні рівняння, які враховували паралельні шляхи проникання речовин в мембрані. Але отримане ними загальне рішення є дуже складним для аналізу. Для отримання більш легких для трактування рішень було зроблено ряд спрощень для окремих випадків. Зокрема, рівняння $\sigma_i = 1 - \omega_i V_i / L_p$, справедливості якого обмежується гідрофільними речовинами, коли паралельний потік речовини крізь ліпідну фазу в порівнянні з потоками крізь водні пори є малим. Використання цих рішень для ліпофільних речовин не забезпечує адекватного опису потоків крізь еритроцитарні мембрани. Експериментальні результати для N-етилацетаміду та N-метилпропіонаміду щодо концентраційної залежності їх проникності крізь мембрану еритроцита показують, що загальний потік речовини можна розкласти на два потоки: один, що насичується, крізь канал; другий, лінійний, крізь ліпідну фазу.

Важливо підкреслити, що так само потрібно було врахувати цей чинник і для бутандіолів в роботі [26]. Тоді характеристики проникання 2,3-бутандіола не здались би авторам аномальними.

Таким чином, аналіз даних, висвітлених в сучасній науковій літературі, показує, що існують два шляхи пасивного проникання води та неелектролітів крізь біологічні мембрани: білковий та ліпідний. Проникність ліпідного бішару вимірювалась в численних експериментах на штучних мембранах та ліпосомах. Є також багато неспростовних доказів існування водних каналів, пов'язаних з білковими компонентами природних мембран. Так, енергія активації самодифузії воді становить десь 4,6 кКал/Моль, що близько до значень енергії активації 4-6 кКал/Моль, виміряних для дифузійної та осмотичної проникностей води в еритроцитах, і значно менше, ніж енергія активації для ліпідних бішарів - 11-14 кКал/Моль. Проникність мембран еритроцитів для води є набагато більшою проникності ліпідних бішарів (в порівнянні з бішарами з фосфатидилхоліну та холестерину - в 10 разів [98]). Осмотична, або фільтраційна проникність (P_f) для мембран еритроцитів в декілька разів вища за дифузійну (P_d), тоді як для штучних бішарів вони рівні. Коефіцієнт відбиття для значної кількості малих полярних електролітів є меншим за одиницю, а коефіцієнт проникності виявляє дискримінацію речовин за розмірами молекул. Проникність мембран еритроцитів для води і малих гідрофільних неелектролітів блокується реагентами, що взаємодіють з SH-групами мембранних білків. І насамкінець, з мембран еритроцитів був виділений білок з сімейства аквапоринів CHIP28, при вбудовуванні якого в різні мембрани з'являються ознаки каналного транспорту.

1.3. Вплив температури на характеристики проникності біологічних мембран

Однією з важливих характеристик транспортних процесів є їх залежність від температури. Вивчення температурної залежності хімічних,

ферментативних, або транспортних процесів може надати цінну інформацію для розуміння молекулярних механізмів цих процесів. Вплив температури на константи швидкостей, що характеризують хімічні або біологічні процеси, часто аналізують в термінах емпіричної енергії активації (E_a) згідно з рівнянням Ареніуса, котре може бути записане як

$$\ln k = E_a/RT$$

де k є константа швидкості процесу, R - газова константа, T - абсолютна температура. На практиці числову величину E визначають з нахилу графіка $\ln k$ від $1/T$ (графік Ареніуса).

Проникання води та розчинених речовин крізь штучні та природні мембрани різними структурно обумовленими шляхами характеризуються різними значеннями видимої енергії активації. Прониканню речовин за каналним механізмом відповідають, як правило, значення енергії активації в діапазоні 3,6-6 кКал/Моль, які узгоджуються з енергіями активації дифузії в об'ємному розчині. При прониканні молекул шляхом розчинення та дифузії в ліпідному матриксі енергії активації набувають значень 8-20 кКал/Моль і навіть більших [24,64,98].

Для більшості хімічних реакцій, а також реакцій, що каталізуються більшістю розчинних ферментів, графік Ареніуса є лінійним в прийнятному температурному діапазоні, хоча в обох випадках існують виключення. Як правило, ентальпії активації вказаних процесів, які відрізняються від їх видимої енергії активації тільки величиною рівною RT (біля 0,6 ккал/моль), є, по суті, температурно незмінними. Проте, для мембранозв'язаних транспортних систем та ензимів часто одержується нелінійний графік Ареніуса [129,130]. В більшості публікацій повідомляється, що графік Ареніуса містить відносно різкий злам між двома (іноді більше) лінійними сегментами, тоді як в деяких випадках графік Ареніуса мембрано-асоційованих функцій зображується гладкою кривою. Зазвичай, навіть різкі зміни у видимій енергії активації мембранного транспорту або ферментативного процесу не супроводжуються значною зміною у швидкості

реакції в точці зламу, хоча в деяких випадках доповідається про справжній стрибок безперервності в графіку Ареніуса [46,131]. Тим не менш, злам, або зміна нахилу в графіку Ареніуса, який не супроводжується значною зміною у швидкості реакції, може бути викликаний великою кількістю причин [132,133].

Використання спрощеної форми емпіричного рівняння Ареніуса супроводжується великою кількістю припущень про процес, що вивчається. Припускається, що геометрія реакції та ентропія активації, як і ентальпія активації, не залежать від температури. Це припущення не завжди справджується навіть для відносно простих хімічних реакцій. Звичайно, якщо просте лінійне співвідношення між $\ln k$ та $1/T$ дійсно отримується для певного процесу, тоді це припущення імовірно справедливе, принаймні у першому наближенні. Але, якщо дійсно побудована ареніусова залежність помітно відхиляється від простого лінійного співвідношення, тоді принаймні один (а можливо і більше) з цих чинників повинен бути температурозалежним. Якщо це так, тоді не можна використовувати спрощену форму рівняння Ареніуса і нахил ареніусової кривої більше не є індикатором ентальпії реакції. Оскільки дуже важко експериментально виділити ентальпію активації, ентропію активації та внесок у швидкість процесу геометрії реакції і температурних залежностей, на практиці правильна інтерпретація ареніусової залежності біологічного процесу, яка відхиляється від простого лінійного співвідношення, є дуже складною [134].

Потрібно також зазначити, що ареніусова залежність ензиматичної реакції або транспортного процесу буде лінійною тільки якщо лише один тип каталізатора є відповідальним за хімічний процес при його вивченні, або тільки якщо один окремий крок у всій реакції лімітує її швидкість у всьому температурному діапазоні, що досліджується. У біологічних мембранах мембранні ензиматичні реакції і транспортні процеси є, в основному, комплексними, багатокроковими процесами, і кожна часткова реакція у загальному процесі може мати різну температурну залежність [130]. В роботі

[132] обговорювали впливи температури на швидкості ензиматичних реакцій взагалі і сформулювали експериментальні підходи для розпізнавання та інтерпретації для найбільш тривіальних ефектів температури. Ці ефекти можуть включати такі речі як нерозпізнані, спричинені температурою зміни рН водного буферу, в'язкості розчину та субстрат-зв'язуючої здатності. Han [132] проаналізував різні чинники, які можуть спричинити нелінійність в графіках Ареніуса ферментативної реакції, і класифікував їх на дві категорії: (1) термодинамічні чинники, що включають всі вторинні рівноважні реакції, які модифікують елементарні процеси, що каталізуються, та (2) кінетичні чинники, що мають відношення до змін на лімітуючій швидкості процесу стадії, які мають місце в межах експериментального діапазону температур. Хоча зазначений аналіз був розвинутий для розчинних ферментів, він може бути застосований також до мембранних ферментів та транспортних систем.

Було зроблено декілька спроб розвитку кількісного систематичного аналізу теоретичних основ для нелінійних графіків Ареніуса в мембранозв'язаних системах, беручи до уваги унікальні властивості цих систем внаслідок їх існування в ліпідному оточенні, текучість та фазовий стан яких може також змінюватись з температурою. Wynn-Williams [135] припустив, що несподівані зміни видимої енергії активації мембранних ферментів можуть бути спричинені одночасною наявністю чистих ліпідів (в гелевому стані) та ферментно-ліпідних комплексів (в рідкому стані) в мембрані. Якщо активність ферментів залежить від складу ферментно-ліпідного комплексу, температурна залежність розчинності ліпідів у ферментно-ліпідній фазі може привести до різких змін видимої енергії активації в діапазоні температур фазового переходу ліпиду, тоді як функціональна активність молекул ферменту не зазнає розриву. Внаслідок цього дійсна ентальпія "активованого стану" ферментативної реакції більше не є рівною нахилу Ареніусової залежності активності ферменту в діапазоні фазового переходу. Якщо це трактування є загалом вірним для мембранних ферментів і транспортних систем, воно усуває теоретичні труднощі, оскільки

більше не потрібно припускати, що значні зміни в ентальпії активації обов'язково повинні точно компенсуватись зміною ентропії активації при температурі зламу. Тим не менше, було показано [136] існування притаманної енерго-ентропійної компенсації для пасивної проникності простих ліпідних бішарів при температурах їх фазового переходу. Thilo et al [137] надали докази спричинених фазовим переходом мембранних ліпідів змін активностей деяких транспортних систем, які узгоджуються з припущеннями Wynn-Williams про різний розподіл транспортних систем в гелі та рідинно-кристалічні домени. В роботі [138] на $Mg^{2+} + Na^{+}$ -АТФазі плазматичних мембран *A. laidlawii* В було показано, що фізичний стан зв'язаних ліпідів, які оточують фермент, видимо, скоріше визначає його активність, аніж ліпідний склад. Нарешті, автори роботи [139] систематично вивчили співвідношення швидкість-температура для різноманітних фізичних моделей швидкості мембранних процесів, щоб передбачити властиву кожній ареніусову залежність. Більшість моделей дають графік, який може бути апроксимований двома прямими, що перетинаються, з цілком помірною експериментальною помилкою, особливо, якщо зміна нахилу відбувається біля температури зламу, який відповідає зміні видимої енергії активації менше ніж 15-20 кКал/Моль, а досліджена температурна область невелика. Цей результат вказує на необхідність ретельного аналізу даних ареніусових залежностей для обережної інтерпретації фізичних причин зламу ареніусових графіків. Необхідність ретельного визначення дійсних максимальних швидкостей мембранозв'язаних процесів у великій кількості експериментальних температур для правильної інтерпретації ареніусових залежностей була підкреслена декількома групами [140].

В багатьох роботах був встановлений зв'язок між зламами ареніусових залежностей мембранозв'язаних процесів з фазовими переходами в ліпідах мембран. Наявність структурних переходів в плазматичних мембранах прокаріотичних та еукаріотичних клітин описано різними групами авторів [141]. Еритроцитарні мембрани вирізняються серед інших високим вмістом

холестерину. Саме через це калориметричні та рентгеноскопичні дослідження не виявили в них термотропних переходів у діапазоні позитивних температур [142,143]. Але наявність таких структурних переходів у мембранах еритроцитів в діапазоні 0-50°C була показана різними фізико-хімічними методами [141,144,145]. Структурні зміни, залучені в ці переходи, не зовсім ясні через складність та анізотропію мембран. Показано, наприклад, що латеральна мобільність глікопротеїнів змінюється перервано з температурою і контролюється цитоскелетними білками [141]. В роботі [145] було показано, що в мембранах еритроцитів має місце ліпід-залежний термотропний перехід при 20°C, який зсувається до 15°C після протеолітичної обробки незапечатаних тіней. Багато робіт присвячено дослідженню змін структурно-функціональних параметрів мембран еритроцитів в області 18-20°C. За цих температур спостерігаються злами на графіках Ареніуса транспорту глюкози в інтактних еритроцитах та їх тінях [146], затухання фотохемілюмінесценції білків мембран, активності мембранної ацетилхолінестерази, полегшеної дифузії L-лейцину [143]. При цій же температурі зареєстровано злам на температурній залежності осмотичної стійкості еритроцитів [143]. Ретельні дослідження цього феномену за допомогою різноманітних спинових міток і зондів показали, що незалежно від хімічної природи спинових радикалів, що використовувались в експериментах, критичні температури як для ферментативної активності, так і для структурних змін в ліпідному бішарі, реєструються в тій же області температур (20°C) [147]. Автори зазначають, що такі структурні переходи спостерігаються в тому ж інтервалі температур для мембран, що суттєво відрізняються за своїм ліпідним складом (тіні еритроцитів, мікросоми головного мозку бика, саркоплазматичний ретикулум). Автори також вказують на те, що області білкової молекули Na^+, K^+ -АТФази, що містять SH-групи, характеризуються термоіндукованими конформаційними зсувами при тій же температурі. Обробка препаратів Na^+, K^+ -АТФази фосфоліпазою, яка відщеплює полярні головки молекул фосфоліпідів і порушує

електростатичну взаємодію фосфоліпідів з білками, не знищує термоіндукованих переходів у ліпідному бішарі, але графіки Ареніуса для активності $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-АТФази}$ стають лінійними. Це ще раз підкреслює важливий вплив білок-ліпідних взаємодій на термотропні переходи в білку.

В роботі [148] було досліджено вплив температури на рухливість вільного та навантаженого транспортера нуклеозиду в еритроцитах людини. Показано, що температурна залежність максимальної швидкості рівноважного обміну ^3H -урідину зазнавала зламу зі зменшенням енергії активації при температурах, вищих 30°C . В той же час рухливість вільного транспортера зазнавала термотропних змін при температурах, нижчих 15°C . На думку авторів, вплив температури на рухливість навантаженого та вільного транспортера урідину пов'язаний з термотропними змінами в оточуючому середовищі, наприклад, в ліпідах мембрани.

При дослідженні властивостей мембран еритроцитів в області температур від 20°C до фізіологічних автори роботи [149] показали, що проникність мембран до фарбника АНС зазнає ряд термоіндукованих змін. При цьому, в інтервалах температур $20\text{-}28^\circ\text{C}$ та $36\text{-}42^\circ\text{C}$ величини енергії активації процесу добре відтворювались в різних дослідках і мали достатньо великі значення (111 та 144 кДж/Моль відповідно), тоді як для діапазонів температур $28\text{-}36^\circ\text{C}$ та $42\text{-}46^\circ\text{C}$ варіювали для різних дослідів і мали низькі значення. Показано [150], що ліпосоми ДМФХ/ДПФХ втрачають іони K^+ у діапазоні температур $28\text{-}32^\circ\text{C}$. Ареніусові залежності рухливості малеїмідної та йодацетамідної спинових міток, ковалентно зв'язаних з білками спектрин-актинового комплексу еритроцитів людини та їх тіней, зазнають зламу при температурах 30°C та $10\text{-}12^\circ\text{C}$. Це свідчить про конформаційний перехід водно-білкової поверхні цитоскелетних білків в еритроцитах [151-153].

Дослідження рухливості малеїмідної мітки [154], що зв'язується з білками в мембранах еритроцитів, а саме зі спектрином, показало, що в діапазоні температур між 10°C та 25°C так званий параметр безпорядку був стабільним. Збільшення температури вище 25°C викликало різке збільшення

цього параметру, а зниження температури нижче 10°C приводило до його зменшення.

Відомий інтервал температур, в якому спостерігаються особливості ходу температурних залежностей різних функціональних параметрів мембран еритроцитів лежить в діапазоні 8-12°C. Це загальновідома критична температура як для процесу лізису, так і запечатування тіней [141,145]. Ліпофільна спинова мітка 16NS (спин-мічений аналог стеаринової кислоти, що має нитроксильний фрагмент в 16 положенні), введена в інтактні еритроцити, виявляє суттєві зміни в рухливості при $8 \pm 1,5^\circ\text{C}$. Методом ЕПР [151,153] також показано, що при 10-12°C спостерігається злам Ареніусової залежності частоти обертання йодацетамідної мітки, зв'язаної з SH-групами гідрофобних областей цитоскелетних білків еритроцитів. Це корелює з даними ареніусової залежності флюоресценції мембранних білків, що має злам при температурі 12°C [142]. На близьку до цього інтервалу температуру (15°C) вказується у роботі [143] як на температуру зламу ареніусової залежності швидкості обмінної дифузії для Cl^- . При дослідженні нами температурної залежності часу обміну молекул води еритроцитами [46] виявлено, що в області температур 8-12°C графіки Ареніуса для еритроцитів окремих донорів зазнають розриву із суттєвим збільшенням енергії активації процесу при температурах нижче 8°C. В області розриву результати вимірювань були нестабільними та мали великий розкид. Це свідчить про те, що перебудови в структурі мембрани здійснюються не миттєво, а впродовж деякого часу на протязі скінченного температурного інтервалу. Якщо прийняти до уваги, що існування білкових каналів, проникних для води та малих неелектролітів, зв'язують з аніонобінним білком смуги 3 [24], а також той факт, що периферичні білки актин-спектринового комплексу еритроцитів взаємодіють з інтегральним білком смуги 3 та з ліпідним бішаром [97,143], то можна вважати, що наявність зламу Ареніусових залежностей в цій області температур для всіх зазначених вище процесів є проявом одних і тих самих перебудов в білок-ліпідному комплексі еритроцитарних мембран.

В роботі [141] за допомогою спинові мітки 16-NS було досліджено вплив послідовної селективної екстракції білків на структурний перехід в області 8°C і показано зв'язок цих термотропних перебудов з білком смуги 4.1. При видаленні цього білка з мембран еритроцитів структурний перехід в області 8°C повністю зникав. При реконструкції ж очищеного білка 4.1 у везикули з мембран еритроцитів, збіднених за актином та спектрином, перехід знов відновлювався. Висновок про зв'язок структурного переходу в мембранах еритроцитів при температурі 8°C з білком смуги 4.1 був підтверджений даними про вплив Ca^{2+} на цей білок. Еритроцити обробляли Ca^{2+} -йонифором A23187 в присутності позаклітинного Ca^{2+} , що приводить до селективного протеолізу деяких цитоскелетних білків. Було показано, що найбільшого впливу такої кальцієвої обробки зазнає білок смуги 4.1, яка зникає після 20 хвилин інкубації з Ca^{2+} -йонифором. Також, щоб ідентифікувати білки, залучені до структурного переходу при температурі 8°C, було досліджено вплив на нього специфічних білкових антитіл. Показано, що інкубація з антитілами до білка 4.1 повністю знищувало структурний перехід при температурі 8°C, який виявляли за допомогою спинові мітки 16-NS.

Оборотність переходу при температурі 8°C узгоджується з тим, що білок смуги 4.1 взаємодіє з іншими елементами мембрани шляхом специфічної високоспорідненої білок-білкової асоціації [141]. Можливо, білок смуги 4.1 відіграє ключову роль як в скелет-мембранній взаємодії, так і стабілізації комплексу зі спектрином та актином. Pasternack et al. [155] показали, що білок смуги 3 є одним з інтегральних мембранних білків, до яких може приєднуватись білок 4.1. Цей скелет-мембранний комплекс, за думкою авторів [141] є ймовірним кандидатом в мембранні домени, що відповідають за структурний перехід при 8°C.

Складно надати точні пояснення фізичних змін, що відповідають за перехід при 8°C, оскільки анізотропія мембрани заважає чіткому визначенню руху спинові мітки всередині біологічної мембрани. Зміна властивостей

мембрани внаслідок розгортання скелетних білків, як це відбувається в зоні структурного переходу при 40°C, при низькій температурі видається неможливою. На думку авторів роботи [141], більш імовірною гіпотезою є білок-залежне латеральне фазове розділення ліпідів з точки зору відомої білок-ліпідної взаємодії білка 4.1 [97,155]. З цією гіпотезою узгоджуються дані, отримані методом раманівської спектроскопії, які свідчать про перехід, спричинений ліпідами, або ліпід-білковими доменами при 10°C [141].

З температурою 8-12°C також тісно пов'язане явище гіпертонічного криогемолізу (ГК). Існує дуже багато експериментальних свідчень, що охолодження нижче саме цих температур після витримки еритроцитів в гіпертонічному середовищі викликає пошкодження та лізис еритроцитів. Green, Jung [156] показали, що для виникнення пошкоджуючої дії ГК температура, при якій здійснюється перша стадія цього процесу (витримка в гіпертонічному середовищі) повинна бути вище 20°C, а друга стадія (охолодження) нижче 15°C. Автори роботи [145] також зазначають, що ГК стає більш значним, якщо перед охолодженням еритроцити експонуються при температурі, вищій за 19°C, а охолоджуються до температури нижче 7°C. При цьому, величина ГК зростає при збільшенні температури експозиції від 19 до 30°C. Подальше збільшення температури експозиції зменшує величину ГК. В цій же роботі [145] показано, що температурна залежність гіпотонічного гемолізу має особливості при температурах близько 10°C та 20°C. Методом ЕПР було досліджено емпіричний індекс текучості мембран еритроцитів та ідентифіковано три температури, при яких відбуваються зміни рухливості спинової мітки 16-DSA - 8, 20 та 40°C. Тобто, на думку авторів, температури термотропних структурних переходів у мембранах еритроцитів, що реєструються за допомогою спинової мітки, є критичними температурами для процесів гіпотонічного гемолізу та ГК. Фактично, при температурах, нижчих 8°C, еритроцити легко лізують в обох випадках, тоді як при температурах, вищих 20°C, мембрани еритроцитів стають більш резистентними до осмотичного та температурного шоків.

Було досліджено вплив рН, обробки глютаральдегідом та хлорпромазіном на спектри ЕПР та показано, що ті чинники, які знищують особливості в температурній залежності рухливості спинової мітки, збільшують також резистентність клітин до гіпотонічного гемолізу та ГК. Оскільки ні одна із застосованих обробок не знищувала перехід при 20°C, залишаючи перехід при 8°C, автори роботи [145] не змогли дати точної відповіді про важливість для резистентності переходу при 20°C, тоді як термотропний перехід при 8°C, на їх думку, є однозначно важливим. Автори вважають, що відповідальними за зміну резистентності еритроцитів до лізису є процеси латеральної фазової сепарації мембранних компонентів в діапазоні температур між 20 та 8°C. Вплив температури на структуру мембран викликає фактично, "не ідеальне" змішування компонентів мембрани, що спричинює появу пограничних областей. Зменшення осмотичної резистентності при температурах, нижчих 10°C, може бути наслідком існування таких "граничних ефектів" між областями з різним упорядкуванням компонентів.

Автори робіт [157,158] шляхом мікроскопічного спостереження ГК виявили, що клітини зберігали сплющений вигляд до температури приблизно 10°C, після чого еритроцити у випадкові моменти часу за 1-2 с перетворювались в сфери і знебарвлювались впродовж хвилини, втрачаючи гемоглобін. Takahashi et al. [159,160] методом ЕПР-спектроскопії вивчали дію осмотичного стресу та температури на еритроцити людини. Вони показали, що залежність характерного часу обертання мітки від температури в координатах Ареніуса має злам при 10°C, вказуючи на те, що при цій температурі виникають структурні зміни на кшталт фазового переходу. При цій же температурі (8-10°C) на замороженій-сколотій поверхні мембран спостерігається значна агрегація внутрішньомембранних часток (ВМЧ) [160]. Автори роботи прийшли до висновку, що в цих умовах відбувається суттєва перебудова, яка стосується мембранного цитоскелета, оскільки зв'язок білка смуги 3, з яким асоціюють ВМЧ в електронно-мікроскопічних препаратах

мембран еритроцитів, з білками цитоскелета обмежує його латеральну рухливість [97,149].

Звертаючись до важливості впливу водного середовища на структуру та функції біологічних макромолекул та мембран, необхідно зазначити, що властивості води на поверхні розподілу, включаючи біологічні мембрани, відрізняються від властивостей вільної води [142]. Наявність гідратаційних сил, очевидно, пов'язана з тим, що молекули води, які межують і взаємодіють з полярними голівками фосфоліпідів утворюють шар, в якому існує позиційний і орієнтаційний порядок, що зменшується в міру віддалення від поверхні. Найбільш характерною особливістю води біля поверхні розподілу є наявність виражених температурних аномалій, які не спостерігаються у вільній воді [161]. Так, наприклад, ареніусова залежність зміни в'язкості води біля поверхні розподілу характеризується наявністю максимумів при температурах 15, 32 та 45°C. Навіть розчинення у воді невеликих біологічних молекул, таких як дипептиди, спричиняє відхилення від монотонного ходу температурної залежності положення смуги води (5180 см^{-1}) [162]. У системі вода-іони-білки методом ІК-спектроскопії виявлені немонотонні ослаблення Н-зв'язків води в інтервалах 15-17°C, 25-28°C і 35-38°C, та протилежні ефекти в інтервалах 18-21°C, 29-32°C і 39-41°C [163].

Ці температурозалежні властивості води та її зв'язків з молекулами, макромолекулами та мембранними структурами також можуть впливати на процеси масопереносу крізь біологічні мембрани. Так, в роботі [164] вивчали вплив включення в ліпідний склад ліпосом диестер-, диєфір- та диалкілфосфатидилхолінів та холестерину на їх проникність до неелектролітів. Показано, що важливу роль в проникності ліпідних бішарів відіграє здатність фосфоліпідів утворювати Н-зв'язки з холестерином та молекулами води всередині мембрани. У мембрані, яка містить диєфірфосфатидилхолін ліпід-ліпідні водневі зв'язки стають майже неможливими, що призводить до зменшення енергії активації проникнення мочевины та гліцерину крізь такі бішари.

Отже, температура - це важливий чинник, що впливає на структуру та функцію біологічних мембран. Вивчення ж температурних залежностей тих чи інших мембранозв'язаних процесів є інформативним методом для дослідження механізмів цих процесів. Аналіз наукової літератури з цього питання показує, що існує принаймні три температурних діапазони, в яких спостерігаються аномалії ходу температурних залежностей процесів, пов'язаних з мембранами еритроцитів: 8-12, 18-20 та 28-30°C, іноді вказують температуру 25°C. Скоріше за все, зменшення температури нижче фізіологічної приводить до безперервних змін у взаємовідносинах структурних елементів мембрани – ліпідів, білків та води, які найбільше проявляються в деяких характерних температурних точках. Термотропний перехід в мембранах еритроцитів в області 8-12°C є найбільш вираженим і пов'язаний зі структурними змінами, в які залучені всі компоненти мембрани, як ліпіди, так і цитоскелетні та інтегральні білки, що звичайно ж взаємодіють з водним середовищем.

1.4. Геометричні параметри еритроцитів

Геометричні параметри еритроцитів мають важливе фізіологічне значення. Це обумовлено, в першу чергу, необхідністю проходження еритроцитів крізь найменші капіляри в циркуляційному руслі. Здатність цих клітин до деформації тісно пов'язана з їх формою. Від геометрії еритроцитів також залежить швидкість обміну клітин киснем, вуглекислим газом та іншими речовинами з оточуючим середовищем. Тому відхилення геометрії клітин від нормальної може мати негативний вплив на їх основну функцію - забезпечення тканин організму киснем.

Геометрія еритроцита та його здатність до деформації тісно пов'язана з віком клітини. У всіх досліджених видів тварин і людини еритроцити функціонують в крові скінчений проміжок часу. Показано, що тривалість

життя еритроцитів людини становить біля 120 днів, якщо вони не руйнуються з інших причин, крім старіння [165,166]. Ступінь випадкового руйнування і середня потенціальна тривалість життя еритроцитів видоспецифічні. Показано, що коефіцієнт випадкової загибелі еритроцитів є незначним в крові людини. Збільшення випадкового руйнування спостерігається при деяких захворюваннях і може бути індуковане зовнішніми чинниками [166]. Старіння еритроцитів є комплексним процесом і стосується практично всіх компонентів клітини. Воно супроводжується зміною активності метаболізму, іонного та водного складу клітин, структури та функції мембран, об'єму клітини та її форми, стійкості до пошкоджуючих екзогенних чинників (наприклад до осмотичного або кислотного гемолізу) [19,166].

Фізичні навантаження на еритроцити створюються через необхідність деформуватись при проходженні крізь капілярну сітку та селезінковий синус. Еритроцити мають надзвичайні фізико-еластичні властивості. Мембрани еритроцитів зберігають структурну цілісність, хоча зазнають великих стресів і деформацій, зберігають високу здатність до деформації. Еритроцити ссавців впродовж свого життя в циркуляційному руслі проходять $1.7 \cdot 10^5$ разів через систему кровообігу протягом 30-200 днів залежно від виду.

Існує дві точки зору на механізм руйнування еритроцитів. Згідно першої тривалість життя еритроцитів в крові визначається одним з найбільш важливих фізіологічних параметрів клітини – її здатністю до деформації [167], від чого залежать реологічні властивості крові при мікроциркуляції. Інша точка зору на загибель еритроцитів в організмі ґрунтується на уявленні про зміну поверхневої структури мембрани, що приводить до розпізнавання і руйнування "старих" клітин макрофагами та лімфоцитами [166,168]. Скоріше за все обидва механізми контролюють процес видалення старих еритроцитів з циркуляційного русла в організмі. Зменшення здатності до деформації лежить в основі патогенезу і тісно корелює зі скороченням часу життя еритроцитів при різних захворюваннях. У хворих на спадковий сфероцитоз,

серпоподібну клітинну анемією, аутоімунний сфероцитоз, при гемоглобінопатіях еритроцити мають меншу здатність до деформацій і пов'язаний з цим зменшений строк життя. [19,166,169]. Зниження здатності до деформації також спостерігається зі збільшенням віку еритроцитів. Показано, що найбільш суворі вимоги щодо здатності еритроцитів до деформації виявляє особливий вид будови судинного русла в селезінці, що є свого роду клітинним фільтром. Тому не дивно, що спленектомія часто супроводжується значним збільшенням тривалості життя еритроцитів та появою у крові найменш здатних до деформації клітин [170]. Хоча вважають, що у здорових людей руйнування у селезінці еритроцитів, котрі погано деформуються, є не єдиним механізмом видалення старих еритроцитів, все ж на його долю припадає значний відсоток загальної ефективності цього процесу [171].

Відомо, що здатність до деформації залежить в основному від форми клітин, а саме від відношення площі поверхні клітини до її об'єму [166,172]. Вперше площу поверхні мембрани і об'єм окремих еритроцитів донорської крові виміряли Rand,Barton [18]. Вони фотографували під мікроскопом окремі еритроцити, початково суспендовані в ізотонічному розчині Рінгера, після їх наступного контакту з гіпотонічним розчином хлориду натрію і визначали площу поверхні їх мембрани і об'єм. Зокрема, автори цієї роботи прийшли до висновку, що мембрана еритроцита не може розтягуватись більше, ніж на 20%, до гемолізу. Canham,Parkinson [173] і Canham,Barton [174] також вимірювали геометричні параметри окремих еритроцитів, фотографуючи їх зі швидкістю 1 кадр/хв в процесі їх перетворення з дискоцита в сфероцит. Повільне набрякання клітин досягалось за рахунок повільного проникнення води в камеру, де знаходились клітини, крізь діалізну мембрану. Коли еритроцити ставали сферичними, площа їх зображення вимірювалась планіметром. Автори роботи [174] дослідили геометрію еритроцитів семи донорів, включаючи новонародженого, (всього 10^{16} клітин). За даними цих авторів у фізіологічному розчині Рінгера площа

поверхні мембрани еритроцита людини в середньому становить $138,1 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2$, а об'єм еритроцита є рівним $107,5 \cdot 10^{-18} \text{ м}^3$. За даними роботи [175] площа поверхні мембрани еритроцита донорської крові в середньому дорівнює $152 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2$, а об'єм еритроцита - $90 \cdot 10^{-18} \text{ м}^3$. Яу [20], використовуючи уточнений в порівнянні із зазначеними вище авторами метод обведення профілю еритроцита на його фотографічному зображенні, отримав такий результат: площа поверхні мембрани еритроцита в ізотонічному розчині Рінгера становить $136,9 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2$, об'єм клітини - $104,2 \cdot 10^{-18} \text{ м}^3$.

В роботі [20] було вивчено геометричні параметри 788 клітин в розчині Рінгера та 843 клітин в тому ж розчині з додаванням сироваткового альбуміну. Показано, що такі параметри, як площа поверхні, об'єм, діаметр, мінімальний циліндричний діаметр, індекс сферичності та індекс набрякання, не є однаковими для всіх клітин, а розподілені за нормальним законом. Індексом сферичності автори називають відношення гіпотетичної площі поверхні сфери, що має об'єм еритроцита, до площі поверхні сфероцита (реальної площі поверхні цього еритроцита), тобто $4,84V^{2/3} / S$. Якщо виразити цю величину через об'єми то вона є відношенням початкового об'єму еритроцита до об'єму цієї клітини в стані сфероцита в ступені $2/3$. Індекс набрякання автори визначають як відсоток збільшення об'єму при набряканні до стану сфероцита, тобто $V_{\text{сф}} - V_0 / V_0$. Автори визначили, що індекс набрякання для різних клітин варіює від 20 до 70 відсотків і в середньому становить 45,0% в фізіологічному розчині Рінгера. Додавання в суспендуючий розчин альбуміну зсуває цей розподіл в бік більших величин. Індекс набрякання в цьому випадку варіює від 25 до 80 відсотків. Слід зазначити, що введені авторами індекси (сферичності та набрякання) є обернено залежними. Кожний з них однозначно визначає інший. Тому не дивно, що індекс сферичності в розчинах з альбуміном зменшувався до 0,769 порівняно з розчином Рінгера, де він становив 0,773.

У роботі [176] геометричні параметри еритроцитів визначали методом інтерференційної голографії, котрий дозволяє визначити межі клітини більш

точно, ніж в попередніх роботах. При отриманні зображення клітини за допомогою звичайного світлового мікроскопа граничний контур клітини є суттєво розмитим через дифракцію світла. Тому точне визначення геометричних параметрів клітини неможливе. Похибка, спричинена цим фактором, становить 0,25-0,5 мкм, або 3-6% для діаметра клітини та 10-20% для її товщини. Запропонований авторами [177,178] метод дозволяє зменшити похибку визначення діаметра до 0,5-1%, до 1% для товщини клітини та до 1% для площі поверхні та об'єму. На підставі аналізу 1581 еритроцита від 14 осіб автори [176] визначили, що площа поверхні клітинної мембрани є рівною $129,95 \pm 15,86 \cdot 10^{-12} \text{ м}^2$ а об'єм еритроцита $97,91 \pm 16,6 \cdot 10^{-18} \text{ м}^3$. Вони також показали, що геометричні параметри еритроцитів мають розподіл, близький до нормального. Значення діаметру коливались в межах від 5,77 до 10,09 мкм, середнє значення становило 7,65 мкм. Площа поверхні мала граничні величини 86,32 та 205,42 мкм², об'єм клітин - 47,82 та 167,69 мкм³. Індекс сферичності, визначений як і в роботі [20], знаходився в діапазоні 0,505-0,909 із середнім значенням 0,792. Автори зазначають, що отриманий ними доволі значний розкид параметрів, визначається великою кількістю виміряних клітин від різних осіб. Аналогічні результати роботи [177] мали менший розкид, оскільки вимірювались геометричні параметри еритроцитів однієї людини.

В роботі [19] вивчали геометричні параметри еритроцитів та їх здатність до деформації в залежності від віку клітин для еритроцитів мишей, кролика та людини. Здатність клітин до деформації вимірювали за допомогою осмотично-градієнтної ектацитометрії. Еритроцити втягували в мікропіпетку на ділянці, близької до западини, і вимірювали довжину проекції клітини в піпетці як функцію тиску. Модуль (μ) розраховували згідно з рівнянням: $\mu = (R_p^2 / 2,45) dP/dL$, де dP/dL є величина, обернена до нахилу залежності “довжина-тиск”. Вимірювання площі поверхні та об'єму еритроцитів здійснювали шляхом втягування еритроцитів в мікропіпетку з внутрішнім діаметром від 1 до 1,5 мкм під тиском близько 6 дин/см². При

цьому клітина набувала вигляду сфери плюс циліндрична проекція всередині піпетки. Вимірювали діаметр зовнішньої сферичної частини еритроцита та довжину втягнутої в піпетку частки клітини. З цих вимірювань розраховували площу поверхні, об'єм, сферичність (яку визначали аналогічно індексу сферичності в роботі [20]) та мінімальний циліндричний діаметр (тобто діаметр найменшого капіляра, крізь який може проходити клітина). Показано, що для фракції з найбільшою густиною, в котрій, як вважається, знаходиться найбільше старих клітин, спостерігається статистично вірогідне зменшення як площі, так і об'єму клітин. Хоча середня величина сферичності клітин в цій фракції вірогідно не відрізнялась від такої для цілісної крові, розкид цього параметра був значно більшим. Клітини з цієї фракції мали також меншу здатність до деформації. Всі вивчені параметри мали розподіл, близький до нормального, але характеристики розподілу були різними для різних фракцій.

Отже стає очевидним, що при вивченні властивостей еритроцитів продуктивним є підхід з позицій уявлення про еритроцити, як про популяцію клітин, властивості яких не є однаковими. Тобто сукупність еритроцитів є закономірно неоднорідною множиною, в якій суттєву інформацію містить сама неоднорідність розподілу клітин за їх властивостями. Неоднорідність еритроцитарної популяції не є випадковою, а характеризує стан системи крові в цілому [17,19,176,179]. Склад еритроцитарної популяції закономірно змінюється з віком не тільки в добре відомі моменти зміни первинного кровотворення дефінітивним або плодового гемоглобіну дорослим, але постійно, впродовж всього періоду розвитку [17]. Різні види захворювань також можуть стати причиною відхилення розподілу клітин за їх властивостями від норми. Такими властивостями можуть бути вік, форма, розмір, активності клітинних ферментів і т.п. Суттєвим є те, що клітинна популяція при такому підході характеризується не тільки середніми значеннями досліджуваних величин, але і видом їх розподілу в популяції. Між тим абсолютна більшість методів, як біохімічних, так і біофізичних

обмежується модальними значеннями параметрів, статистично найбільш забезпеченими. При цьому нівелюються відмінності між клітинами в популяції. В той же час для клітинних популяцій розподіл клітин в процесі онтогенезу або при різних патологіях може значно відхилятися від нормального, бути відчутно асиметричним, або полімодальним [17,179,180]. Очевидно, що в таких випадках саме форма розподілу, а не середнє значення є найбільш інформативним і адекватно описує популяцію.

В зв'язку з цим для характеристики клітинної популяції найбільш прийнятним є розподіл клітин за властивостями, який відбиває закономірну неоднорідність клітинного складу. Переваги такого підходу до дослідження клітинних популяцій є очевидними, але він пов'язаний зі значними методичними труднощами. Цей підхід потребує переходу від загального середнього аналізу до поклітинного. Трудомісткість аналізу різко зростає, що унеможливорює широке застосування в наукових дослідженнях, а тим більше в клінічній практиці. Як видно з попереднього аналізу, не тільки визначення розподілу клітин за геометричними параметрами, але й визначання середніх значень цих параметрів є дуже складним і потребує багато часу, навіть при умові наявності техніки для точного визначення цих параметрів, яка сама є зазвичай складною.

В [39] вимірювали розподіл еритроцитів за об'ємом за допомогою апертурного лічильника. Суть метода описана в розділі 1.1. За допомогою цієї апаратури автори отримали бімодальний розподіл еритроцитів за об'ємом. Проте цей метод був підданий критиці. Було показано, що велику помилку в вимірювання вносять клітини, що проходять по краях отвору. Тому результати, отримані цим методом є недостатньо надійними.

В роботі [21] запропоновано метод "лазерного цитомоніторингу" для визначення розмірів еритроцитів. Метод розроблено на підставі вимірювання малокутового розсіювання когерентного світла суспензією клітин. Для визначення функції розподілу часток за розмірами, яку визначають за індикатрисою розсіювання світла, автори вирішують обернену задачу

розсіювання. Головним недоліком цього методу є необхідність громіздких розрахунків функцій розподілу, які повинні виконуватись попередньо для кожного набору клітин, та побудова калібрувальних кривих. До того ж, отриманий таким чином результат представляє собою функцію розподілу за так званім ефективним радіусом, який визначає не форму клітини, а лише її усереднений розмір.

Отже, виходячи з відомих в науковій літературі даних, можна зазначити, що геометричні параметри еритроцитів є надзвичайно важливими для характеристики функціональної повноцінності цих клітин. Найбільш повну інформацію з цього питання можуть надати не тільки середні значення тих чи інших параметрів, а функції їх розподілу, оскільки розкид параметрів є притаманною властивістю популяції еритроцитів окремого індивідуума і може бути показником стану системи кровотворення. В той же час, навіть визначення середніх значень геометричних параметрів еритроцитів є складною та трудомісткою експериментальною задачею. Отримання ж всього спектру величин, що характеризують розміри та форму клітин, набагато ускладнює проблему. Тому, розробка методів, які б надали можливість порівняно швидко визначити розподіл якогось із важливих геометричних параметрів еритроцитів, є актуальною задачею як для наукових досліджень, так і для клінічної діагностики.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Матеріали

Дослідження проведені на еритроцитах крові дорослих здорових донорів і людей з ендокринною патологією (гіпо- та гіпертиреоз), яку отримували на Харківській обласній станції переливання крові і в клініці при Інституті проблем ендокринної патології ім. В.Я.Данилевського АМНУ, а також на еритроцитах пуповинної крові людини, яку одержували методом, описаним в [181] у пологових відділеннях Харківських клінік. В якості консерванту в усіх випадках використовували консервуючий розчин “Глюгіцир”.

Проникність мембран еритроцитів людини визначали для речовин низки діолів (1,2- та 1,3-пропандіол; 1,2-, 1,3-, 1,4- та 2,3-бутандіол), етиленгліколю, ді- та триетиленгліколю, диметилсульфоксиду (ДМСО), низки амідів (ацетамід, метилацетамід, диметилформамід та диметилацетамід), гліцерину та низки його моноалкілових ефірів: (1-монометилловий ефір гліцерину (1-ММЕГ), 1-моноетилловий ефір гліцерину (1-МЕЕГ), 1-моноізопропіловий ефір гліцерину (1-МІПЕГ)). Моноалкілові ефіри гліцерину були синтезовані та очищені фракційною перегонкою у вакуумі у відділі кріопротекторів ІПКіК НАНУ. Чистоту речовин контролювали методом газорідинної хроматографії. Будова похідних гліцерину підтверджувалась порівнянням розрахованих та експериментальних значень молекулярної рефракції, а також методом ІК-спектроскопії [182]. Всі інші речовини були марки “х.ч.” або “ч.д.а.”, додатково очищені у відділі кріопротекторів ІПКіК НАНУ. Очищення діолів здійснювали шляхом подвійної вакуумної перегонки (тиск не більше 2 мм рт.ст.) після попередньої абсорбції на активованому окисі алюмінію. Гліцерин очищували однократною перегонкою з преабсорбцією на

активованому вугіллі. Проникність визначали для 1 М концентрацій речовин за температури 20°C (якщо не зазначено інше).

В якості блокатора водних білкових каналів використовували сульфгідрильний реагент *p*-Chloromercuribenzenesulfonic Acid Monosodium Salt фірми SIGMA (pCMBS). Обробку еритроцитів блокатором проводили за рекомендаціями, наданими в роботі [87], тобто інкубацією з 2 мМ pCMBS впродовж 1 години при 22°C. Після інкубації еритроцити відмивали фосфатним буфером pH 7,4.

2.2. Методи дослідження

2.2.1. *Теоретичні методи.* В теоретичній частині роботи використовували фундаментальні принципи термодинаміки необоротних процесів [183,184], теорії пружності тонких оболонок при кінцевих деформаціях [185], теорії випадкових процесів [186] і гідродинаміки (за малих чисел Рейнольдса) [187], метод асимптотичного інтегрування системи сингулярних рівнянь з малим параметром [188], теорію Мі розсіювання світла сферичними однорідними частинками в наближенні аномальної дифракції [189,190].

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за методом Фішера-Стьюдента з використанням *t*-критерію та кореляційного аналізу [191].

2.2.2. *Теоретичні основи використання методу малокутового розсіювання світла.* Основні експериментальні результати були отримані методом малокутового розсіювання світла суспензією еритроцитів [192,193]. Принцип реєстрації світла, розсіяного на різні кути, давно використовується для визначення розмірів клітин [194]. Теоретичний аналіз процесів поглинання і розсіювання електромагнітних хвиль малими частинками поданий в роботах [189,190]. Розсіювання світла біологічними суспензіями

визначається неоднорідностями, якими є вміщені в рідину клітини і макромолекули. Взаємні відстані, які втричі перевищують радіус частинок, є достатніми для того, щоб вважати їх незалежними розсіювачами. Іншою необхідною умовою, котра значно спрощує аналіз та інтерпретацію результатів вимірювань за розсіюванням світла, є можливість нехтування багаторазовим розсіюванням. Пряма пропорційність між інтенсивністю розсіювання і кількістю часток має місце лише за умови, якщо випромінювання, що падає на частинку, не залежить від її положення в шарі. Тобто необхідно, щоб оптична товщина об'єкта що вивчається, була малою. З теоретичних міркувань також впливає, що вимірювання за принципом розсіювання світла є найбільш ефективними в разі, коли розмір частинок має порядок довжини хвилі. З урахуванням того, що клітини зважені у водному розчині в невеликій кількості, а коефіцієнт заломлення води по відношенню до вакууму становить 1,33, отримуємо, що довжина хвилі безпосередньо в клітинній суспензії буде становити $(1/1,33)$ мкм. Якщо розмір частинок приблизно співпадає з довжиною падаючої хвилі, то головний внесок в екстинкцію надає розсіювання, а не поглинання.

У відповідності до строгої теорії розсіювання світла сферичними частинками маємо, що інтенсивність розсіяного під малим кутом θ світла сферичною частинкою радіуса R , яка освітлюється паралельним пучком з інтенсивністю I_0 , визначається виразом [189]:

$$J(\theta) = (2\pi/\lambda)^2 (R^4/r^2) F(\rho, z) \quad (2.1)$$

де

$$\rho = 2x(n^{\text{in}}/n^{\text{out}} - 1), \quad z = x\theta, \quad x = 2\pi R n^{\text{out}}/\lambda \quad (2.2)$$

λ - довжина хвилі світла, що падає на розчин з показником заломлення n^{out} , в якому вміщена сфера, r – відстань від сфери, що розсіює світло, до фотоприймача.

Оскільки, як показано в нашій роботі, в процесі гіпотонічного гемолізу, починаючи з моменту, коли об'єм клітини перевищує значення $S_0^{3/2}/6\sqrt{\pi}$, еритроцит представляє собою пульсуючу в часі сферу, об'ємний вміст гемоглобіну в якій стрибкоподібно змінюється в моменти, коли в мембрані еритроцита утворюється чергова макроскопічна пора, і насамкінець падає до нуля, формулу (2.1) можна використовувати для розрахунку інтенсивності світла, що розсіюється сфероцитом, як функції часу в перебігу цього процесу. При цьому, зазвичай, вважається [195], що внеском мембрани в розсіювання можна знехтувати і розчинені всередині клітини речовини рівномірно розподілені по об'єму клітини.

Залежність коефіцієнта заломлення внутрішньоклітинного розчину від об'ємної концентрації гемоглобіну, тобто від параметра α/y ($\alpha=V_n/V_0$ – об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин, V_n – об'єм осмотично неактивних речовин, тобто, практично, об'єм гемоглобіну всередині клітин, V і V_0 – об'єм клітини в поточному і початковому стані, $y=V/V_0$ – відносний об'єм клітини) можна подати у вигляді

$$n^{\text{in}} = n^{\text{out}} + (n_{\text{Hb}} - n^{\text{out}})[1 - \exp(-k\alpha/y - \alpha)] \quad (2.3)$$

де n_{Hb} – показник заломлення гемоглобіну, який можна вважати дійсним в червоній області спектру видимого світла, оскільки спектральні смуги поглинання гемоглобіну розташовані в блакитній області спектра. Зазначимо, що формула (2.3) дає правильні граничні значення n^{in} при $\alpha/y \rightarrow 0$ ($n^{\text{in}} = n^{\text{out}}$) і при $\alpha/y \rightarrow 1$ ($n^{\text{in}} = n_{\text{Hb}}$), вона є інваріантною відносно заміни об'ємної концентрації гемоглобіну на об'ємну концентрацію розчинника, тобто відносно заміни $\alpha/y \rightarrow 1 - \alpha/y$. Коефіцієнт пропорційності k є підгоночним параметром, який можна визначити, порівнюючи теоретично розраховану за допомогою (2.1) інтенсивність розсіяного світла з визначеною експериментально.

В теорії розсіювання дуже важливим є параметр $x=2\pi Rn^{\text{out}}/\lambda$. Ефективний діаметр еритроцита становить приблизно 5,6 мкм, отже при вибраній довжині хвилі ($\lambda=10^{-6}$ м) $x=22,4$. У відповідності до строгої теорії розсіювання світла на сферичних частинках при збільшенні параметра x від 1 до 20 індикатриса розсіювання стає все більш витягнутою в напрямі малих кутів, а відношення розсіювання вперед і назад зростає в сотні разів. В області $x>20$ індикатриса розсіювання розпадається на декілька пелюсток. Зі зростанням параметра x число максимумів в індикатрисі розсіювання стає більшим. Таким чином, індикатриса розсіювання складається з низки пелюсток, які є симетричними відносно оптичної осі і зменшуються за інтенсивністю при збільшенні кута дифракції. Для часток довільної форми індикатриса розсіювання може мати доволі складний вигляд.

Індикатриса розсіювання світла суспензією еритроцитів має два максимуми при малих кутах (3° і 9°), які відповідають величинам діаметра еритроцитів та їх товщині. При вміщенні клітин в гіпотонічне середовище внаслідок набрякання еритроцитів відбувається перерозподіл інтенсивностей в максимумах, що вказує на збільшення частки еритроцитів відповідного розміру. Кутове положення максимумів при цьому змінюється несуттєво. Тому при розробці приладу був вибраний кут вимірювання 9° , оскільки вимірювання в першій пелюстці (під кутом 3°) має значні експериментальні труднощі в зв'язку зі складністю розділення падаючого та розсіяного світла. Для нашої установки ($\lambda=10^{-6}$ м і $\theta=\pi/20$) $k=9$ (у формулі 2.3). Коефіцієнт заломлення позаклітинного розчину є приблизно рівним коефіцієнту заломлення води (1,33). Коефіцієнт заломлення гемоглобіну $n_{\text{Hb}}=1,4$ [196]. Таким чином (2.3) можна представити у вигляді

$$n^{\text{in}}-n^{\text{out}}=0,05[1-\exp(-9\alpha/y-\alpha)] \quad (2.4)$$

З урахуванням наведених даних знаходимо, що у випадку, який розглядається, параметри (2.3) при розсіюванні під кутом 9° до напрямку падаючого пучка світла становлять

$$\rho = 0,05(4\pi R/\lambda)[1 - \exp(-9\alpha/y - \alpha)], \quad z = 2\pi^2 R n^{\text{out}}/20\lambda \quad (2.5)$$

Очевидно, $R = (3V_0 y/4\pi)^{1/3}$. Якщо, крім того, $\lambda = 10^{-6}\text{м}$, то з урахуванням вищевикладеного можна стверджувати, що параметри ρ , x і $(n^{\text{in}}/n^{\text{out}} - 1)$ при гіпотонічному гемолізі змінюються в межах

$$0 \leq \rho \leq 2,75; \quad 27,6 \leq x \leq 34,5; \quad 0 \leq (n^{\text{in}}/n^{\text{out}} - 1) \leq 0,03$$

Відомо, що при виконанні сильних нерівностей $x \gg 1$, $(n^{\text{in}}/n^{\text{out}} - 1) \ll 1$ і проміжних значеннях параметра ρ (так званий випадок аномальної дифракції) точне рішення Мі для розсіювання однорідною сферою можна з великою точністю апроксимувати наближеним рішенням, при якому

$$F(\rho, z) = \frac{\pi}{2} \frac{\rho^2}{2(\rho^2 + z^2)^{3/2}} I_{3/2}^2 \sqrt{\rho^2 + z^2} + \frac{\rho^4}{z^4} [I_2(z) - \frac{1}{1.3} \xi I_3(z) + \\ + \frac{1}{1.3.5} \xi^2 I_4(z) - \frac{1}{1.3.5.7} \xi^3 I_5(z) + \dots]^2 \quad (2.6)$$

де I_ν - функція Бесселя першого роду ν -ого порядку, $\xi = \rho^2/z$ і ряд у квадратних дужках сходиться при будь-яких комбінаціях ρ і z . Підставляючи (2.6) в (2.1) з урахуванням (2.2) і (2.5), після нескладних перетворень знаходимо, що інтенсивність світла, розсіяного еритроцитом під кутом 9° до напрямку падаючого пучка, є рівною

$$\begin{aligned}
J = J\left(\frac{\pi}{20}\right) = Cy & \left\{ \frac{1}{\left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y-\alpha}\right)\right] \left[1 + \frac{\pi^2 (n^{out})^2}{4 \left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y-\alpha}\right)\right]^2}\right]} x \right. \\
& \times J_{3/2}^2 \left(\frac{0,2\pi \left(\frac{3V_0 y}{4\pi}\right)^{1/3} \left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y-\alpha}\right)\right]}{\left[1 + \frac{\pi^2 (n^{out})^2}{4 \left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y-\alpha}\right)\right]^2}\right]^{1/2}} \right) + \\
& \frac{6,4 \left(\frac{3V_0 y}{4\pi}\right)^{1/3} \left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y-\alpha}\right)\right]^4}{\lambda \pi^4 (n^{out})^4} \left[J_2 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \right) \left(\frac{3V_0 y}{4\pi}\right)^{1/3} - \right. \\
& \left. - \frac{1}{1 \cdot 3} \xi J_3 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi}\right)^{1/3} \right) + \frac{1}{1 \cdot 3 \cdot 5} \xi^2 J_4 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi}\right)^{1/3} \right) - \right. \\
& \left. - \frac{1}{1 \cdot 3 \cdot 5 \cdot 7} \xi^3 J_5 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi}\right)^{1/3} \right) + \frac{1}{1 \cdot 3 \cdot 5 \cdot 7 \cdot 9} \xi^4 J_6 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi}\right)^{1/3} \right) - \dots \right]^2 \} (2.7)
\end{aligned}$$

$$\text{де } C = \frac{15}{2} \pi \frac{V_0}{\lambda r^2} I_0$$

Знаючи залежність зміни відносного об'єму сфероцита y і вмісту гемоглобіну в клітині α від часу при $y \geq y_s$, за допомогою (2.7) легко отримати залежність інтенсивності розсіяного під кутом $\pi/20$ до напрямку падаючого пучка світла з довжиною хвилі $\lambda_c = 1$ мкм від часу, тобто з точністю до постійного множника, який характеризує підсилення в реєструючій розсіяне світло схемі, показання реєструючого приладу.

2.2.3. Прилад для вимірювання малокутового розсіювання світла клітинною суспензією. Для вимірювання інтенсивності розсіяного суспензією еритроцитів світла під кутом 9° до напрямку падаючого пучка ми використовували розроблений за нашою участю та виготовлений науково-виробничою фірмою “Кріокон” (м. Харків) прилад, в склад якого входять: кюветна камера із системою первісного перетворення сигналу, пристрій для підтримки температури кюветної камери на заданому рівні, система реєстрації результатів вимірювань. Структурна схема приладу подана на рис. 2.1. Об'єм фотометричної кювети становить 3 мл. Пристрій містить колімоване джерело світла (арсенід галієвий діод типу АЛ107Б) з діапазоном спектральної характеристики від 950 нм до 1100 нм і фотоприймач (фотодіод ФК-25К з інтегральною чутливістю $8 \cdot 10^{-3}$ мА/лк), встановлений під кутом 9° до напрямку падаючого пучка. Сумарна потужність ІК-випромінювання при дослідженні зразка не перевищує 2,5 Вт.

Виносний кюветний блок обладнаний системами підтримки температури та перемішування досліджуваної суспензії. Датчиком температури кюветної камери є розміщений в ній напівпровідниковий діод. Управління системою термостатування здійснюється електронними засобами авторегуляції. Кювета обертається за допомогою шагового двигуна, що приводить до перемішування суспензії по всьому об'єму кювети за рахунок гідродинамічного гальмування. Спеціальна лопать закріплена на оптично непрозорій кришці кювети і додатково сприяє швидкому перемішуванню суспензії.

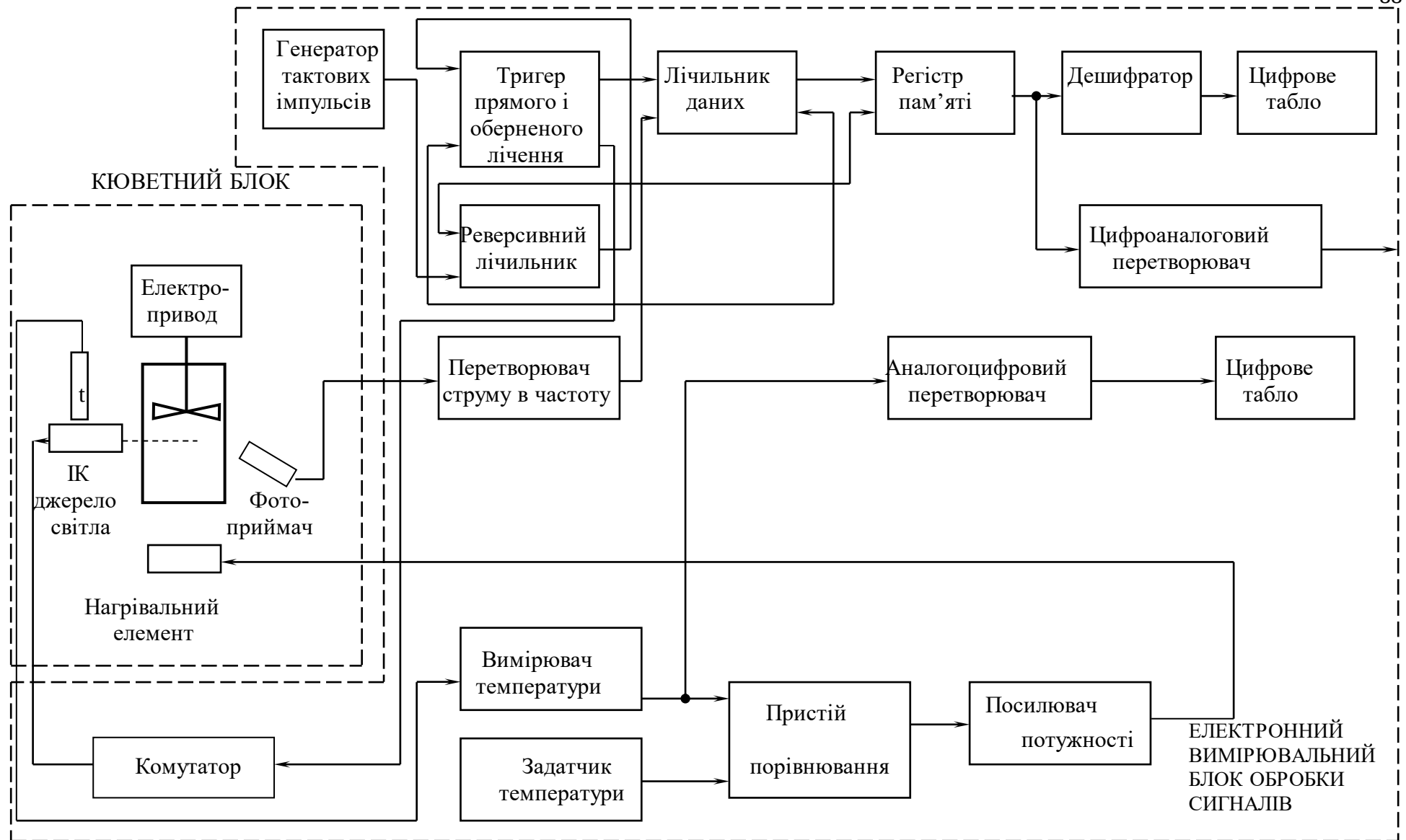


Рис. 2.1. Структурна схема приладу для вимірювання інтенсивності розсіяного світла.

Сигнал з фотоприймача надходить на перетворювач струму в частоту за методом компенсації заряду ємності, в якому аналоговий сигнал перетворюється в нормовану за амплітудою та тривалістю послідовність імпульсів для подальшої цифрової обробки сигналу і виводу на дисплей ПЕОМ у вигляді графіка “інтенсивність розсіяного світла-час”. Програма читання з плати ADC побудована таким чином, що на першому етапі відновлюється значення 7-сегментного коду шляхом зсуву інформації, прочитаної з буферних регістрів. Після цього встановлюється відповідність 7-сегментного коду його десятинному еквіваленту, прочитаному з АПЦ.

Отримане число помножується на ціну поділу і результат представляє собою абсолютне значення вихідної напруги, вираженої в мілівольтах. Таким чином, масив цифрових даних обробляється за допомогою ЕОМ в ході проведення експерименту і на екран дисплею виводяться такі дані: інтенсивність світла, розсіяного кюветою з розчином (нульова лінія); максимальне значення інтенсивності світла, розсіяного досліджуваною суспензією, і час, за який досягається це максимальне значення; час, за який інтенсивність падає до значення, що відповідає 50% гемолізу, розрахований за нашою моделлю коефіцієнт проникності.

2.2.4. Експериментальне визначення малокутового розсіювання світла клітинною суспензією. Нами досліджена залежність інтенсивності розсіювання вперед суспензією еритроцитів від кількості клітин в ній. На рис.2.2. приведена калібрувальна крива, з якої видно, що при додаванні до фізіологічного розчину більш, ніж 0,015 мл крові, інтенсивність розсіювання не збільшується. Очевидно, при цьому кількість клітин в суспензії стає настільки великою, що виникає ефект багаторазового розсіювання. Реєстрацію кінетичних ефектів, пов'язаних зі збільшенням об'єму клітин або зменшенням їх кількості, проводили надалі в лінійному діапазоні.

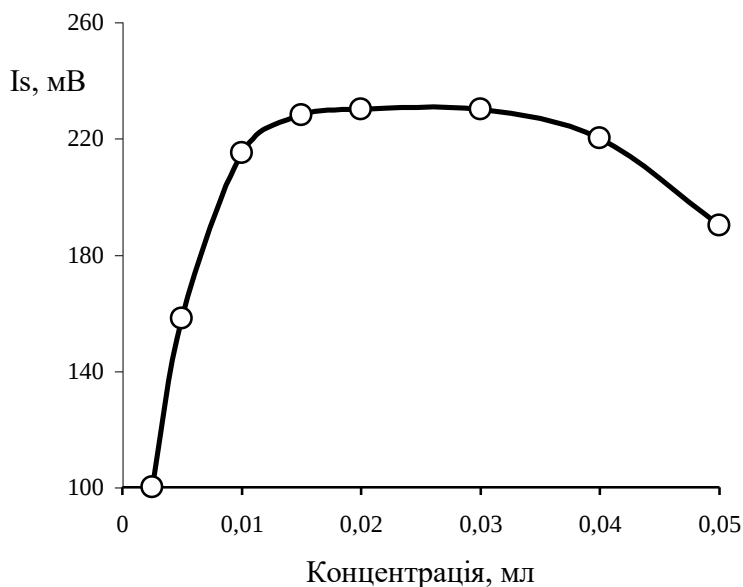


Рис. 2.2. Інтенсивність розсіяного світла в залежності від кількості крові, доданої до 3 мл фізіологічного розчину

2.2.5. *Експериментальне визначення коефіцієнтів проникності еритроцитів для електронейтральних речовин.* В експериментах по визначенню коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів 3 мл водного розчину досліджуваної речовини вміщували в кювету. Після реєстрації нульової лінії в розчин вносили еритроцити (від 0,003 до 0,01 мл в залежності від концентрації клітин у зразку) і записували кінетичну криву гіпотонічного гемолізу в розчині проникаючої речовини (рис.2.3).

Побудована теорія процесу гіпотонічного гемолізу в комбінації з теорією розсіювання Мі дозволяє розрахувати залежність інтенсивності розсіяного під певним кутом світла із заданою довжиною хвилі від часу при різних значеннях коефіцієнта проникності мембран еритроцитів для розчиненої в позаклітинному середовищі речовини. За певних умов експерименту після відповідного підбору значення коефіцієнта проникності експериментальна та теоретична криві збігаються (рис. 2.4).

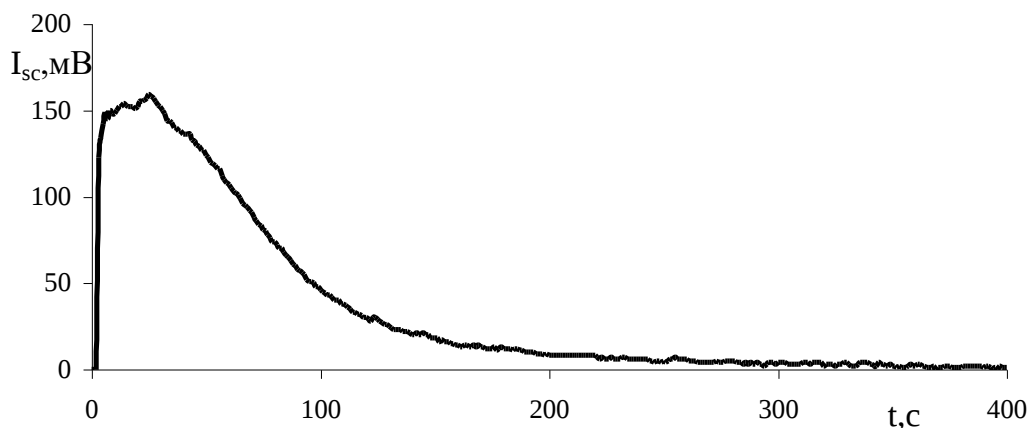


Рис. 2.3. Експериментальна кінетична крива інтенсивності розсіяного світла суспензією еритроцитів при гіпотонічному гемолізі у водному розчині проникаючої речовини

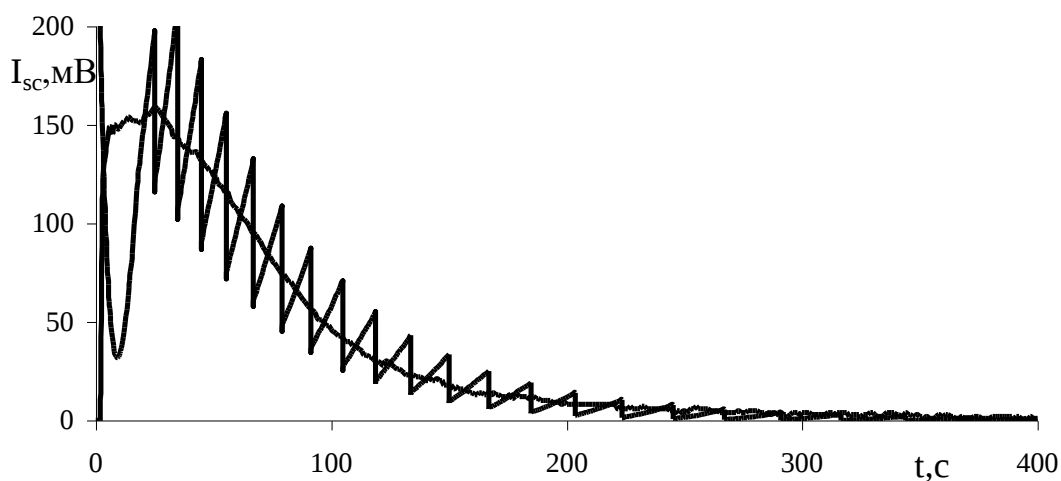


Рис. 2.4. Суміщення експериментальної та теоретичної кривих розсіювання світла суспензією еритроцитів при гіпотонічному гемолізі

Саме шляхом суміщення експериментальної залежності та теоретичної кривої, розрахованої за відповідних значень коефіцієнта проникності, і визначається останній параметр. Коефіцієнти проникності автоматично розраховуються на ЕОМ за алгоритмом, отриманим на підставі розробленої

нами фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу у водному розчині проникаючої речовини.

2.2.6. *Експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності.* Для визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності у вимірювальну кювету приладу, що містить 3 мл розчину хлориду натрію з концентрацією в діапазоні від 0,15 до 0,05 Моль/л, додавали відповідну кількість (однакову в кожній серії) еритроцитів. За даними малокутового розсіювання та калібрувальною кривою визначали відсоток збережених клітин в гіпотонічних розчинах непроникаючої речовини (NaCl) і отримували криві осмотичної крихкості (рис.2.5). На відміну від звичайного, загальноприйнятого, методу визначення осмотичної крихкості, застосування методу малокутового розсіювання дозволяє уникнути помилок, що пов'язані з додатковими механічними впливами на клітини при центрифугуванні, і прискорити процедуру визначення.

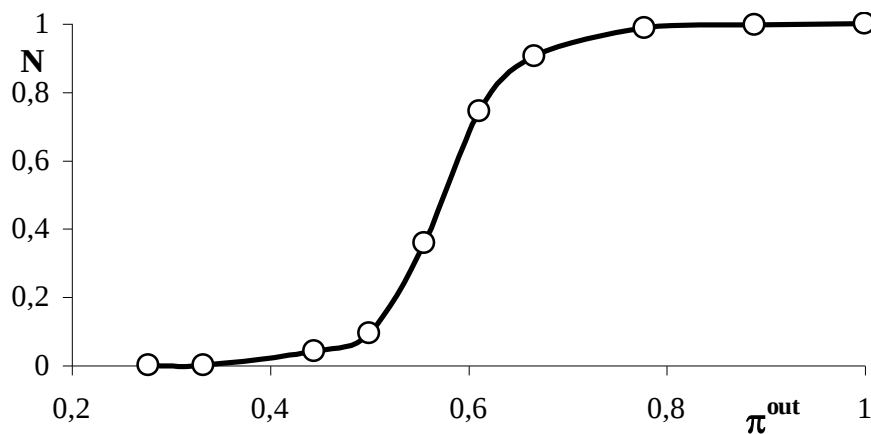


Рис. 2.5. Характерна крива осмотичної крихкості еритроцитів людини

Відомо, що при набряканні об'єм еритроцита збільшується тільки за рахунок зміни його форми без зміни площі поверхні аж до досягнення сферичної форми. Відомо також, що розтяг мембрани еритроцита лише на 4% приводить до його негайного розриву. Але, як показує експеримент і теоретичний аналіз, на відміну від звичайного пружного тіла, мембрана

розривається і за значно менших розтягів, але за більший проміжок часу. Тобто, будь-який ізотропний розтяг мембрани приводить до її розриву, якщо спливає достатньо великий проміжок часу. Оскільки ізотропний розтяг мембрани відбувається тільки після того, як еритроцит набуває сферичної форми, можна стверджувати, що всі клітини, які набули в певному гіпотонічному розчині сферичної форми, прогемолізують. Перетворення еритроцита в сфероцит в розчині з певною гіпотонічністю однозначно пов'язано з початковим значенням сферичного індексу: чим менше сферичний індекс клітини, тим менша гіпотонія потрібна для досягнення сферичної форми. Знаючи кількість клітин, що прогемолізували в розчинах різної гіпотонічності, яку відображують криві осмотичної крихкості, можна знайти розподіл сферичного індексу у вихідній суспензії $N(y_s)$, тобто долю клітин, сферичний індекс яких не перевищує значення y_s (рис. 2.6). Похідна цієї функції по y_s і є щільністю розподілу клітин за індексом сферичності (рис. 2.7).

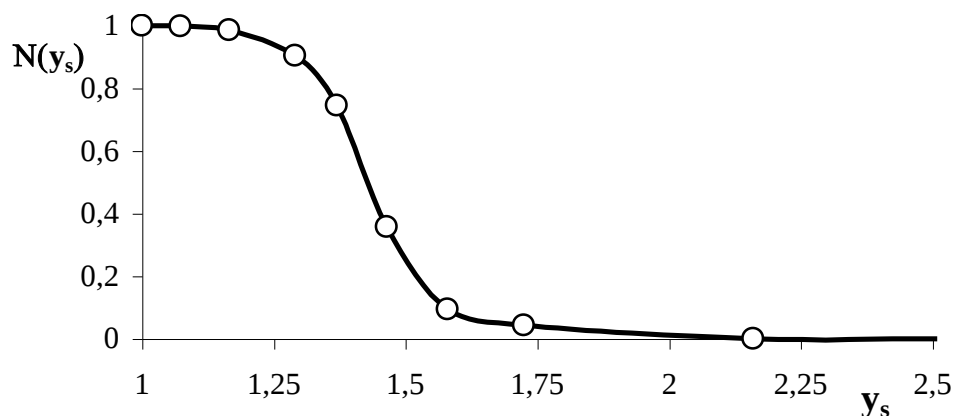


Рис. 2.6. Характерна функція розподілу відносного об'єму (y_s), при якому еритроцит перетворюється у сферу, в популяції еритроцитів людини

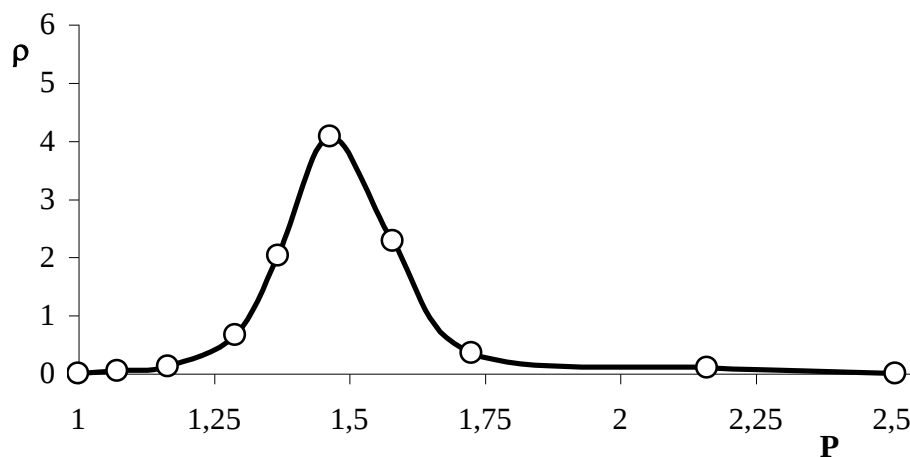


Рис. 2.7. Характерна функція щільності розподілу еритроцитів людини за індексом сферичності

Таким чином, криві щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності визначали з експериментальних кривих осмотичної крихкості на підставі розробленої нами фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу в розчині непроникаючої речовини.

РОЗДІЛ 3

ТЕОРЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ ПРОЦЕСІВ ПАСИВНОГО ТРАНСМЕМБРАННОГО МАСОПЕРЕНОСУ

3.1 Джерело ентропії і рівняння руху багатоконпонентного розчину

Традиційний вивід рівнянь балансу ентропії для багатоконпонентних рідких розчинів в лінійній термодинаміці необоротних процесів (ТНП) є не зовсім задовільним з наступних причин. По-перше, при звичайному виводі не використовуються рівняння балансу імпульсу для окремих компонентів розчину, а питома внутрішня енергія U , як і для однокомпонентного континуума, визначається (у відсутності зовнішнього поля) як різниця між повною енергією фізично елементарного об'єму рідини і кінетичною енергією руху його центра мас. При такому визначенні внутрішня енергія елементарного об'єму розчину містить в собі кінетичну енергію макроскопічної дифузії компонентів, із яких складається розчин, відносно центру мас елементу рідини, тоді як за фізичним сенсом внутрішня енергія U^* повинна містити внесок лише від теплового хаотичного руху молекул і не залежати від макроскопічних параметрів. На відсутність задовільного підходу до виводу рівнянь тепломасопереносу в багатоконпонентних системах і необхідність подальших досліджень в цій царині звернув увагу І.Дьярматі [183].

Друга причина, з якої існуючий наразі підхід до феноменологічного виводу основних співвідношень ТНП є не зовсім задовільним, полягає в наступному. У відповідності з так званою гіпотезою локальної рівноваги припускається, що справедливе для термодинамічно рівноважних систем співвідношення Гібса

$$d(\rho s) = \frac{1}{T} d(\rho u) - \sum_k \frac{\mu_k}{T} d\rho_k \quad (3.1)$$

де ρ - густина розчину,

T – абсолютна температура,

s , u , μ_k – віднесені до одиниці маси ентропія, внутрішня енергія та хімічний потенціал k -го компонента відповідно,

ρ_k – густина (маса одиниці об'єму) k -го компонента розчину,

є справедливим і у відсутності термодинамічної рівноваги для будь-якого елементарного об'єму уздовж шляху його центру мас [184]

$$\frac{d\rho s}{dt} = \frac{1}{T} \frac{d\rho u}{dt} - \sum_k \frac{\mu_k}{T} \frac{d\rho_k}{dt} \quad (3.2)$$

де t – час.

Тут ρu визначається як різниця між питомою повною енергією ρe елемента об'єму за вирахуванням кінетичної енергії руху його центру мас $1/2 \rho \vec{v}^2$ і потенціальної енергії у зовнішньому консервативному полі

$$\rho u = \rho e - \frac{1}{2} \rho \vec{v}^2 - \sum_k \rho_k \psi_k$$

де $\vec{v}$ - швидкість руху центру мас елемента рідини,

ψ_k - скалярний потенціал зовнішнього поля, віднесений до одиниці маси k -го компонента.

Звичайно, сумнівів у справедливості співвідношення (3.1) для термодинамічно рівноважних систем немає, якщо у стані термодинамічної рівноваги рух окремих компонентів розчину, які містяться у фізично елементарному об'ємі, відсутній. Внаслідок цього, ρu і

$\rho u^* = \rho e - \frac{1}{2} \sum_k \rho_k \bar{v}_k^2 - \sum_k \rho_k \psi$ не відрізняються одне від одного. При повній термодинамічній рівновазі

$$\rho s = \rho s(\rho u, \rho_k) = \frac{1}{T} \rho u - \sum_k \frac{\mu_k}{T} \rho_k \quad (3.3)$$

Із (3.1) і (3.3) витікає так зване співвідношення Гібса-Дюгема

$$\rho u d \frac{1}{T} - \sum_k \rho_k d \frac{\mu_k}{T} = 0$$

Але у відсутності повної термодинамічної рівноваги немає підстав заперечувати існування іншої залежності між ентропією і величинами, які є адитивними інтегралами руху, а саме

$$\rho s = \rho s(\rho u^*, \rho_k, \rho_k \bar{v}_k) = \rho s(\rho u^*, \rho_k, \bar{v}_k) \quad (3.4)$$

$$\text{де } \rho u^* = \rho u - \frac{1}{2} \sum_k \rho_k (\bar{v}_k - \bar{v})^2,$$

$$\mu_k^* = \mu_k - \frac{1}{2} (\bar{v}_k - \bar{v})^2.$$

Підкреслимо, що змінні $\bar{v}_k - \bar{v}$ є величинами, інваріантними відносно перетворення Галілея як різниці двох величин, що однаково перетворюються при цьому перетворенні.

Метою даної роботи є відшукування аргументів на користь переваги (3.4) в порівнянні з (3.3) на підставі аналізу наслідків, що витікають зі співвідношення (3.4), та виведення рівнянь тепломасопереносу в багатокомпонентних розчинах з урахуванням рівняння руху окремих компонентів.

Звичайно, при $\vec{v}_k - \vec{v} = 0$ рівності (3.3) і (3.4) співпадають одна з одною.

Але все ж залежність (3.4) має переваги перед (3.3) для термодинамічно нерівноважних систем з тієї причини, що у випадку багатокомпонентної системи приводить до умов термодинамічної рівноваги для дифузійних потоків. Дійсно, оскільки ентропія замкнутої в цілому системи за термодинамічної рівноваги приймає максимально можливе значення, повинна обертатись на нуль варіація функціонала

$$\int_V \rho s(\rho u^*, \rho_k, \vec{v}_k) dV + \alpha \int_V \rho e dV + \beta \int_V \sum_k \rho_k \vec{v}_k dV + \gamma \int_V \sum_k \rho_k dV \quad (3.5)$$

$$\text{де } \rho u^* = \rho e - \frac{1}{2} \sum_k \rho_k \vec{v}_k^2 - \sum_k \rho_k \psi_k \quad (3.6)$$

α, β і γ - невизначені множники Лагранжа.

Необхідні $(2n+1)$ умови екстремуму функціонала (3.5), тобто термодинамічної рівноваги, мають вигляд

$$\frac{1}{T} = -\alpha, \quad \frac{\vec{v}}{T} = \vec{\beta}, \quad \frac{1}{T} \left[\mu_k^* + \psi_k + \frac{1}{2} (\vec{v}_k - \vec{v})^2 \right] = \gamma + \beta^2,$$

$$\frac{\rho_k (\vec{v}_k - \vec{v})}{T} = \left(\frac{\partial \rho s}{\partial v_k} \right)_{\rho u^*, \rho_k}$$

або

$$\nabla \frac{1}{T} = 0, \quad \text{Grad } \vec{v} = 0, \quad \text{div } \vec{v} = 0, \quad \nabla_T (\mu_k^* + \psi_k) = 0,$$

$$\mu_k^* + \psi_k - \mu_i - \psi_i = 0 \quad (3.7)$$

$$\text{де } \mu_k^* \equiv \left(\frac{\partial \rho u^*}{\partial \rho_k} \right)_{\rho s, \vec{v}_k},$$

$$\frac{1}{T} \equiv \left(\frac{\partial \rho s}{\partial \rho u^*} \right)_{\rho_k, \vec{v}_k}$$

Досвід показує, що за термодинамічної рівноваги в переважній більшості випадків дифузійні потоки $\vec{J}_k = \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v})$ відсутні, отже

$$\left(\frac{\partial \rho s}{\partial \vec{v}_k} \right) = 0 \quad (3.8)$$

тобто $\rho s = \rho s(\rho u^*, \rho_k)$. Тим не менше, в такій екзотичній системі, як надтекуча рідина, умова (3.8) може не виконуватись через відсутність передачі імпульсу між нормальною і надтекучою компонентами розчину [184]. У випадку

неповної локальної рівноваги рівність $\left(\frac{\partial \rho s}{\partial \vec{v}_k} \right)_{\rho u^*, \rho_k} = \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v})$ треба вважати просто визначенням термодинамічної величини, спряженою з $(\vec{v}_k - \vec{v})$. Так само похідні

$$\left(\frac{\partial \rho s}{\partial \rho u^*} \right)_{\rho_k, \vec{v}_k} \equiv \frac{1}{T} \quad \text{та} \quad - \left(\frac{\partial \rho u^*}{\partial \rho_k} \right)_{\rho s, \vec{v}_k} \equiv \mu_k^*, \quad (3.9)$$

звичайно, не співпадають з оберненою температурою і хімічним потенціалом у стані термодинамічної рівноваги і повинні розглядатись як визначення указаних вище величин в нерівноважному стані.

З урахуванням наведених визначень із (3.4) випливає

$$\frac{d\rho s}{dt} = \frac{1}{T} \frac{d\rho u^*}{dt} - \sum_k \frac{\mu_k^*}{T} \frac{d\rho_k}{dt} + \sum_k \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v}) \frac{d\vec{v}_k}{dt} \quad (3.10)$$

або, оскільки

$$\sum_k \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v}) = 0 \quad (3.11)$$

за визначенням масової швидкості, то

$$\frac{d\rho s}{dt} = \frac{1}{T} \frac{d\rho u^*}{dt} - \sum_k \frac{\mu_k^*}{T} \frac{d\rho_k}{dt} + \sum_{k=1}^n \frac{\rho_k (\vec{v}_k - \vec{v})}{T} \frac{d(\vec{v}_k - \vec{v})}{dt} \quad (3.12)$$

Це співвідношення виконується для кожного фізично елементарного об'єму не рівноважної в цілому термодинамічної n-компонентної системи. При цьому визначення (3.3) зберігається, а саме

$$\rho s = \frac{\rho u}{T} - \sum_k \frac{\mu_k}{T} \rho_k = \frac{\rho u^*}{T} + \frac{1}{2T} \sum_k \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v})^2 - \sum_k \frac{\mu_k}{T} \rho_k = \frac{\rho u^*}{T} - \sum_k \frac{\mu_k^*}{T} \rho_k \quad (3.13)$$

$$\text{де } \mu_k = \mu_k^* + \frac{1}{2} (\vec{v}_k - \vec{v})^2$$

а співвідношення Гібса – Дюгема, що випливає зі співставлення (3.12) і (3.13) набуває вигляду

$$\rho u^* d\frac{1}{T} - \sum_k \rho_k d\frac{\mu_k^*}{T} - \sum_k \frac{\rho_k (\vec{v}_k - \vec{v})}{T} d(\vec{v}_k - \vec{v}) = 0 \quad (3.14)$$

Аналог співвідношення Гібса (3.12) не збігається зі співвідношенням

$$\frac{d\rho s}{dt} = \frac{d\rho u}{dt} - \sum_{k=1}^n \mu_k \frac{d\rho_k}{dt} - \sum_{k=1}^n \vec{J}_k \frac{d}{dt} (\vec{v}_k - \vec{v})$$

яке було використано С.Р.де Гроотом і П.Мазуром [184] для виведення рівняння балансу ентропії багатокомпонентного розчину.

З урахуванням прийнятого нами визначення внутрішньої енергії

$$\rho u^* = \rho e - \frac{1}{2} \sum_k \rho_k \vec{v}_k^2 - \sum_k \rho_k \psi_k, \quad \text{рівності} \quad \sum_k \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v}) = 0$$

і умови консервативності діючого на систему зовнішнього поля $\left(\frac{d\psi_k}{dt} = 0 \right)$

можна представити (3.12) у вигляді

$$\frac{d\rho s}{dt} = \frac{1}{T} \frac{d\rho e}{dt} - \frac{1}{T} \sum_k \rho_k \vec{v}_k \frac{d\vec{v}_k}{dt} - \sum_k \left(\mu_k \psi_k + \frac{1}{2} \vec{v}_k^2 \right) \frac{d\rho_k}{dt} - \frac{\vec{v}}{T} \sum_k \rho_k \nabla \psi_k - \frac{1}{T} \sum_k \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v}) \frac{d\vec{v}_k}{dt} \quad (3.15)$$

Рівняння балансу будь-якої екстенсивної величини можна представити у вигляді [183]

$$\frac{d}{dt}(\rho a) = -\text{div} \vec{J}_a + \sigma_a - \rho \text{div} \vec{v}$$

де $\vec{J}_a$ -кондуктивний потік величини a , тобто частина потоку, яка не пов'язана з переміщенням рідини як цілого зі швидкістю $\vec{V}$,

σ_a – джерело величини a , наявність якого обумовлена необоротними процесами, що відбуваються всередині елементарного об'єму розчину.

Рівняння балансу для повної питомої енергії ρe внаслідок закону збереження повної енергії не має джерела:

$$\frac{d}{dt}(\rho e) = -\text{div} \vec{J}_e - \rho \text{div} \vec{v} \quad (3.16)$$

($\vec{J}_e$ - кондуктивний потік повної енергії)

Рівняння балансу маси k -го компонента, як відомо [183,184] має вигляд

$$\frac{d\rho_k}{dt} = -\operatorname{div}\vec{J}_k + m_k - \rho_k \operatorname{div}\vec{v} \quad (3.17)$$

де $\vec{J}_k = \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v})$ - так званий дифузійний потік k -ї речовини,
 m_k – кількість маси k -го компонента, яка виникає в результаті протікання
хімічних реакцій в елементарному об'ємі розчину.

Рівняння балансу імпульсу k -го компонента представимо у вигляді

$$\rho_k \frac{d}{dt} \vec{v}_k = -\nabla_T (\mu_k + \psi_k) - \operatorname{Div} \tilde{\Pi}_k - \sum_i \vec{F}_{ki} \quad (3.18)$$

Тут $\tilde{\Pi}_k$ - кондуктивний потік імпульсу (тензор другого рангу),

$\vec{F}_{ki}$ – сила тертя, яка діє на k -й компонент з боку i -го компонента.

Сумуючи рівняння руху k -го компонента (3.18) за k від 1 до n ,
внаслідок (3.20) і співвідношення Гібса-Дюгема (3.14) отримуємо рівняння
руху n -компонентної рідини у вигляді

$$\rho \frac{d\vec{v}}{dt} = -\operatorname{Div} \sum_k (\vec{J}_k \vec{v}_k + \tilde{\Pi}_k) - \nabla P - \sum_k \rho_k \nabla \psi_k ,$$

що, як і слід було чекати, переходить в рівняння руху однокомпонентної
рідини за $n=1$.

Сила тертя, яка діє на 1 Моль k -го компонента розчину з боку i -го
компонента, є пропорційною відносній швидкості макроскопічного руху
компонентів $\vec{F}_{ki} = f_{ki} (\vec{v}_k - \vec{v}_i)$. Сила тертя, віднесена до одиниці об'єму

розчину, дорівнює $\vec{F}_{ki} = \frac{f_{ki} \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v}_i)}{M_k}$, де M_k – молярна маса k -го

компонента. Сумарна сила тертя, що діє на i -й компонент n -компонентного

розчину з боку інших його компонентів, віднесена до одиниці об'єму, дорівнює

$$\sum_{i=1}^n \vec{F}_{ki} = \sum_{i=1}^n \frac{f_{ki} \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v}_i)}{M_k}. \quad (3.19)$$

Сили тертя є внутрішніми силами, і тому, за третім законом Ньютона, сума всіх сил тертя, що діють в одиниці об'єму n-компонентної рідини, дорівнює нулю:

$$\sum_{k=1}^n \sum_{i=1(i \neq k)}^n \vec{F}_{ki} = \sum_k \sum_i \frac{f_{ki} \rho_k}{M_k} (\vec{v}_k - \vec{v}_i) = 0 \quad (3.20)$$

або

$$\sum_k \sum_i \frac{f_{ki} \rho_k}{M_k} \vec{v}_k = \sum_k \sum_i \frac{f_{ki} \rho_k}{M_k} \vec{v}_i \quad (3.21)$$

Зробивши заміну індексів $k \rightarrow i$, $i \rightarrow k$ у правій частині рівняння (3.21), отримуємо

$$\sum_k \sum_i \left(\frac{f_{ki}}{M_k} \rho_k - \frac{f_{ik}}{M_i} \rho_i \right) \vec{v}_k = 0 \quad (3.22)$$

Оскільки швидкості $\vec{v}_i$ не залежать одна від одної, із (3.22) випливає

$$\sum_{k=1(k \neq i)}^n \left(\frac{f_{ki}}{M_k} \rho_k - \frac{f_{ik}}{M_i} \rho_i \right) = 0 \quad (k, i=1,2,\dots,n) \quad (3.23)$$

або

$$\sum_{k=1(k \neq i)}^n (f_{ki} c_k - f_{ik} c_i) = 0 \quad (k, i=1,2,\dots,n) \quad (3.24)$$

де- $c_i = \frac{\rho_i}{M_i}$ молярні концентрації розчину.

Однорідна система лінійних рівнянь (3.23) відносно коефіцієнтів тертя є перевизначеною, оскільки детермінант матриці її коефіцієнтів дорівнює нулю, і вона має нескінченно багато рішень. Виникаючу при цьому довільність можна усунути, накладаючи на коефіцієнти f_{ki} одну додаткову умову. Найбільш витончене симетричне рішення виходить, якщо в якості додаткової умови прийняти

$$\frac{f_{ki}}{M_k} \rho_k = \frac{f_{ik}}{M_i} \rho_i \quad (i \neq k)$$

за двох визначених значеннях індексів k та i . Тоді рішення системи рівнянь (3.23) буде

$$\frac{f_{ki}}{M_k} \rho_k = \frac{f_{ik}}{M_i} \rho_i \quad (i \neq k) \quad (3.25)$$

або

$$f_{ki} c_k = f_{ik} c_i \quad (3.26)$$

за будь-яких не рівних один одному значень індексів k та i ($k, i = 1, 2, \dots, n$).

Для випадку трьохкомпонентної системи, обираючи для усунення ступеню

довільності в рішенні (3.23), наприклад, $\frac{f_{31}}{M_3} = \frac{\rho_1}{\rho_3} \frac{f_{13}}{M_1}$, отримуємо

$$\frac{f_{12}}{M_1 \rho_2} = \frac{f_{21}}{M_2 \rho_1}, \quad \frac{f_{13}}{M_1 \rho_3} = \frac{f_{31}}{M_3 \rho_1}, \quad \frac{f_{23}}{M_2 \rho_3} = \frac{f_{32}}{M_3 \rho_2} \quad (3.27)$$

або

$$f_{12} = \frac{c_2 f_{21}}{c_1}, \quad f_{13} = \frac{c_3 f_{31}}{c_1}, \quad f_{23} = \frac{c_3 f_{32}}{c_2} \quad (3.28)$$

Таким чином, для описання процесів дифузійного масопереносу в трьохкомпонентній системі достатньо трьох коефіцієнтів взаємного тертя.

Рівняння балансу ентропії має вигляд

$$\frac{d\rho s}{dt} = -\operatorname{div} \vec{J}_s + \sigma_s - \rho s \operatorname{div} \vec{v} \quad (3.29)$$

Підставляючи (3.16-3.18) у (3.29) отримуємо

$$\begin{aligned} \frac{d\rho s}{dt} = & -\left(\frac{\rho u^*}{T} + \frac{P}{T} - \sum_k \frac{\rho_k \mu_k^*}{T}\right) \operatorname{div} \vec{v} - \operatorname{Div} \left(\frac{\vec{J}_q - \sum_k \mu_k \vec{J}_k}{T} \right) + \\ & + \left(\vec{J}_q - \sum_k \mu_k \vec{J}_k \right) \nabla \frac{1}{T} - \frac{1}{T} \left(\sum_k \tilde{\Pi}_k \right) : \operatorname{Grad} \vec{v} - \frac{1}{T} \sum_k \vec{J}_k \nabla (\mu_k + \psi_k) - \sum_k m_k \frac{\mu_k + \psi_k + \frac{1}{2} \vec{v}_k^2}{T} \end{aligned} \quad (3.30)$$

де $\vec{J}_q = \vec{J}_e - \sum_k \vec{J}_k \left(\frac{1}{2} \vec{v}_k^2 + \psi_k \right) - P \vec{v} - \vec{v} \sum_k \tilde{\Pi}_k$ - питомий потік тепла,

P – тиск.

Порівнюючи (3.29) з (3.30), з урахуванням рівняння

$$\rho s = \frac{1}{T} \left(\rho u^* + P - \sum_k \rho_k \mu_k^* \right) \text{ знаходимо питомий потік ентропії}$$

$$\vec{J}_s = \vec{J}_q - \sum_k \mu_k \vec{J}_k, \text{ а також джерело ентропії}$$

$$\sigma_s = \left(\vec{J}_q - \sum_k \mu_k \vec{J}_k \right) \nabla \frac{1}{T} - \frac{1}{T} \left(\sum_k \tilde{\Pi}_k \right) : \operatorname{Grad} \vec{v} - \frac{1}{T} \sum_k \vec{J}_k \nabla (\mu_k + \psi_k) - \sum_k m_k \frac{\mu_k + \psi_k + \frac{1}{2} \vec{v}_k^2}{T} \quad (3.31)$$

З урахуванням термодинамічного співвідношення

$$Td\left(\frac{\mu_k}{T}\right) = (d\mu_k)_T - \frac{h_k}{T}dT,$$

де h_k – парціальна питома ентальпія k -го компонента, джерело ентропії (3.31) можна представити у вигляді

$$\sigma_s = \left(\bar{J}_q - \sum_k h_k \bar{J}_k \right) \nabla \frac{1}{T} - \frac{1}{T} \left(\sum_k \tilde{\Pi}_k \right) : Grad \vec{v} - \frac{1}{T} \sum_k \bar{J}_k \nabla_T (\mu_k + \psi_k) - \sum_k m_k \frac{\mu_k + \psi_k + \frac{1}{2} \bar{v}_k^2}{T} \quad (3.32)$$

Ця формула практично збігається з формулою, яку звичайно отримують при традиційному підході до виводу основних співвідношень термодинаміки необоротних процесів, якщо припустити $\sum_k \tilde{\Pi}_k = \tilde{\Pi}$, де $\tilde{\Pi}$ - в'язкий тензор тиску, який дорівнює сумі в'язких тензорів тиску окремих компонентів розчину. Але надзвичайно суттєвою є та обставина, що ми, на відміну від інших авторів, вивели цю формулу з урахуванням рівнянь руху окремих компонентів. Важливо відзначити, що формула (32) є справедливою навіть у тих випадках, коли ми не нехтуємо прискоренням окремих компонентів, тоді як при традиційному підході опосередковано приймається припущення про відсутність прискорення окремих компонентів відносно центрів мас фізично елементарних об'ємів рідини.

Таким чином, ми отримали вираз для джерела ентропії багатокомпонентного розчину з урахуванням рівнянь руху окремих його компонентів, що до цього часу не було зроблено. Цей результат є принципово важливим для коректної побудови феноменологічної теорії нерівноважних процесів та усуває недолік попередніх підходів до виводу

основних рівнянь термодинаміки необоротних процесів, на які вказувалось у роботі [183].

3.2. Фізична інтерпретація коефіцієнтів пасивного масопереносу як коефіцієнтів тертя

Оскільки при хімічних реакціях сумарна маса та сумарний заряд реагуючих молекул зберігаються, то зміна енергії зовнішнього гравітаційного або електричного полів при хімічних реакціях дорівнює нулю, тобто

$$\sum_k m_k \psi_k = 0$$

У випадку ізотермічних процесів, які мають особливе значення при дослідженні біологічних систем, утворення ентропії, пов'язане з дифузією, визначається виразом

$$\sigma_{sd} = -\frac{1}{T} \sum_k \vec{J}_k \nabla_T (\mu_k + \psi_k) \quad (3.33)$$

або

$$\sigma_{sd} = -\frac{1}{T} \sum_k c_k (\vec{v}_k - \vec{v}) \nabla_T (\bar{\mu}_k + \bar{\psi}_k) \quad (3.34)$$

де $\bar{\mu}_k = \mu_k M_k$ - хімічний потенціал Моля k -го компонента розчину,

$\bar{\psi}_k = \psi_k M_k$ - потенціал зовнішнього консервативного поля, віднесений до 1 Моля k -го компонента.

Оскільки утворення ентропії σ_{sd} внаслідок другого закону термодинаміки є ненегативно визначеною величиною і перетворюється в

нуль за термодинамічної рівноваги, у лінійному наближенні потоки $\vec{J}_k$ повинні бути лінійними функціями термодинамічних сил

$$X_i = \nabla_T (\bar{\mu}_k + \bar{\psi}_k) = \nabla_{T,P} \bar{\mu}_k + \bar{v}_k \nabla P + \nabla \bar{\psi}_k \quad (3.35)$$

тобто

$$J_k = - \sum_{i=1}^n \frac{\alpha_{ki}}{T} \nabla_T (\bar{\mu}_k + \bar{\psi}_k) \quad (3.36)$$

де α_{ki} – феноменологічні коефіцієнти, які у загальному випадку залежать від змінних стану, і підлягають співвідношенню взаємності Онзагера

$$\alpha_{ik} = \alpha_{ki} \quad (3.37)$$

Можна також представити (3.36) у вигляді

$$- \nabla_T (\bar{\mu}_k + \bar{\psi}_k) = \sum_{i=1}^n r_{ki} c_i (\vec{v}_i - \vec{v}) \quad (3.38)$$

де $r_{ki} = \left(\frac{\alpha_{ki}}{T} \right)^{-1}$ - матриця, обернена матриці $\frac{\alpha_{ki}}{T}$.

З іншого боку, із рівняння руху у відсутності прискорення окремих компонентів і градієнтів швидкості отримуємо

$$- \nabla_T (\bar{\mu}_k + \bar{\psi}_k) = \sum_{i=1}^n f_{ki} (\vec{v}_k - \vec{v}_i) \quad (3.39)$$

Порівнюючи (3.38) і (3.39), знаходимо

$$\sum_j \left(\sum_i r_{ki} c_j \delta_{ji} - f_{ki} \delta_{jk} + f_{ki} \delta_{ji} \right) (\vec{v}_j - \vec{v}) = 0 \quad (3.40)$$

Оскільки вектори $(\vec{v}_j - \vec{v})$ є лінійно незалежними

$$\sum_i r_{ki} c_j \delta_{ji} - f_{ki} \delta_{kj} + f_{ki} \delta_{ji} = 0 \quad (i, k, j=1, 2, \dots, n) \quad (3.41)$$

Рівності (41) встановлюють зв'язок між феноменологічними коефіцієнтами

масопереносу $r_{ki} = \left(\frac{\alpha_{ki}}{T} \right)^{-1}$ та коефіцієнтами тертя f_{ki} :

$$r_{kj} = \frac{1}{c_j} \left(\delta_{kj} \sum_i f_{ki} - f_{kj} \right)$$

Для n-компонентного розчину отримуємо

$$r_{kj} = -\frac{f_{kj}}{c_j} \quad \text{при } k \neq j$$

$$r_{kk} = \frac{1}{c_k} \sum_{i \neq k} f_{ki}$$

Для трьохкомпонентного розчину отримуємо

$$\begin{aligned} r_{11} &= \frac{f_{12} + f_{13}}{c_1}, & r_{12} &= -\frac{f_{12}}{c_2}, & r_{13} &= -\frac{f_{13}}{c_3} \\ r_{21} &= -\frac{f_{21}}{c_1}, & r_{22} &= \frac{f_{21} + f_{23}}{c_2}, & r_{23} &= -\frac{f_{23}}{c_3} \\ r_{31} &= -\frac{f_{31}}{c_1}, & r_{32} &= -\frac{f_{32}}{c_2}, & r_{33} &= \frac{f_{31} + f_{32}}{c_3} \end{aligned} \quad (3.42)$$

або з урахуванням формул (3.28)

$$\begin{aligned}
 r_{11} &= \frac{f_{12} + f_{13}}{c_1}, & r_{12} &= -\frac{f_{12}}{c_2}, & r_{13} &= -\frac{f_{13}}{c_3} \\
 r_{21} &= -\frac{f_{12}}{c_2}, & r_{22} &= \frac{c_1 f_{12}}{c_2^2} + \frac{f_{23}}{c_2}, & r_{23} &= -\frac{f_{23}}{c_3} \\
 r_{31} &= -\frac{f_{13}}{c_3}, & r_{32} &= -\frac{f_{23}}{c_3}, & r_{33} &= \frac{c_1}{c_3^2} f_{13} + \frac{c_2}{c_3^2} f_{23}
 \end{aligned} \tag{3.43}$$

Для аналізу процесів масопереносу крізь клітинні мембрани зручно в якості компонентів 1,2,3 розглядати відповідно розчинник (воду), розчинену речовину, та мембрану. Позначимо коефіцієнт тертя між розчиненою речовиною та мембраною f_{23} як f_{sm} , коефіцієнт тертя між розчинником та мембраною f_{13} як f_{wm} і коефіцієнт тертя між розчиненою речовиною та розчинником f_{21} як f_{sw} . Будемо вважати компоненти розчину електронейтральними, тобто $\nabla\psi_i = \nabla\psi_w = 0$. Тоді рівняння (3.38) можна представити у вигляді

$$\begin{aligned}
 -\nabla_T \bar{\mu}_s &= \frac{f_{sw} + f_{sm}}{c_s} c_s (\vec{v}_s - \vec{v}) - \frac{f_{sw}}{c_w} c_w (\vec{v}_w - \vec{v}) - \frac{f_{sm}}{c_m} c_m (\vec{v}_m - \vec{v}), \\
 -\nabla_T \bar{\mu}_w &= -\frac{f_{ws}}{c_s} c_s (\vec{v}_s - \vec{v}) + \left(\frac{f_{ws}}{c_w} + \frac{f_{wm}}{c_w} \right) c_w (\vec{v}_w - \vec{v}) - \frac{f_{wm}}{c_m} c_m (\vec{v}_m - \vec{v}) \tag{3.44}
 \end{aligned}$$

$$-\nabla_T \bar{\mu}_m = -\frac{f_{ms}}{c_s} c_s (\vec{v}_s - \vec{v}) - \frac{f_{mw}}{c_w} c_w (\vec{v}_w - \vec{v}) + \frac{f_{mw} + f_{ms}}{c_m} c_m (\vec{v}_m - \vec{v})$$

або

$$\begin{aligned}
-\nabla_T \mu_w &= f_{ws}(\vec{v}_w - \vec{v}_s) + f_{wm}(\vec{v}_w - \vec{v}_m) \\
-\nabla_T \mu_s &= f_{sw}(\vec{v}_s - \vec{v}_w) + f_{sm}(\vec{v}_s - \vec{v}_m) \\
-\nabla_T \mu_m &= f_{mw}(\vec{v}_m - \vec{v}_w) + f_{ms}(\vec{v}_m - \vec{v}_s)
\end{aligned} \tag{3.45}$$

Введемо позначення $\vec{I}_{ws} = \vec{v}_w - \vec{v}_s$, $\vec{I}_{wm} = \vec{v}_w - \vec{v}_m$, $\vec{I}_{sm} = \vec{v}_s - \vec{v}_m$, за допомогою яких систему рівнянь (3.45) можна представити у вигляді

$$\begin{aligned}
-\nabla_T \mu_w &= f_{ws} \vec{I}_{ws} + f_{wm} \vec{I}_{wm} \\
-\nabla_T \mu_s &= -f_{ws} \frac{c_w}{c_s} \vec{I}_{ws} + f_{sm} \vec{I}_{sm} \\
-\nabla_T \mu_m &= -f_{wm} \frac{c_w}{c_m} \vec{I}_{wm} - f_{sm} \frac{c_s}{c_m} \vec{I}_{sm}
\end{aligned} \tag{3.46}$$

Між потоками $\vec{I}_{ws}$, $\vec{I}_{wm}$ та $\vec{I}_{sm}$ існує лінійна залежність:

$$\vec{I}_{sm} = \vec{I}_{wm} - \vec{I}_{ws} \tag{3.47}$$

так що рівняння (3.46) є лінійно залежними. Виключаючи з системи рівнянь (3.46) потік I_{sm} знаходимо

$$\begin{aligned}
-\nabla_T \mu_w &= f_{ws} \vec{I}_{ws} + f_{wm} \vec{I}_{wm} \\
-\nabla_T \mu_s &= -\left(f_{sm} + f_{ws} \frac{c_w}{c_s} \right) \vec{I}_{ws} + f_{sm} \vec{I}_{wm}
\end{aligned} \tag{3.48}$$

Розв'язуючи цю систему рівнянь відносно величин I_{ws} та I_{wm} , отримуємо

$$\vec{I}_{ws} = - \frac{f_{sm}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + f_{ws} \frac{c_w}{c_s} \right)} \nabla_T \mu_w + \frac{f_{wm}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + f_{ws} \frac{c_w}{c_s} \right)} \nabla_T \mu_s \quad (3.49)$$

$$I_{wm} = - \frac{f_{sm} + f_{ws} \frac{c_w}{c_s}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + f_{ws} \frac{c_w}{c_s} \right)} \nabla_T \mu_w - \frac{f_{ws}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + f_{ws} \frac{c_w}{c_s} \right)} \nabla_T \mu_s$$

З урахуванням залежності (47) маємо також

$$I_{sm} = - \frac{f_{ws} \frac{c_w}{c_s}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + f_{ws} \frac{c_w}{c_s} \right)} \nabla_T \mu_w - \frac{f_{ws} + f_{wm}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + f_{ws} \frac{c_w}{c_s} \right)} \nabla_T \mu_s \quad (3.50)$$

Градiєнти хiмiчного потенцiалу води та розчиненої речовини в мембранi становлять

$$\nabla_T \bar{\mu}_w = \bar{V}_w (\nabla P - \nabla \pi_s) \quad (3.51)$$

$$\nabla_T \bar{\mu}_s = \bar{V}_s \left(\nabla P + \frac{\nabla_{T,P} \bar{\mu}_s}{\bar{V}_s} \right) = \bar{V}_s \left(\nabla P + \frac{\nabla \pi_s}{\bar{V}_s c_s} \right) \quad (3.52)$$

де ∇P , $\nabla \pi_s$, – вiдповiдно градiєнти гiдростатичного тиску в мембранi й осмотичного тиску проникаючої крiзь мембрану розчиненої речовини.

У формулі (3.52) неважливо, відповідає c_s концентрації внутрішньоклітинного чи позаклітинного розчину.

З урахуванням (3.51) та (3.52) рішення (3.49), (3.50) можна представити у вигляді

$$c_w(\vec{v}_w - \vec{v}_m) = - \frac{f_{ws}(c_s v_s + c_w v_w) + f_{sm} c_s v_w}{f_{ws} f_{sm} \frac{c_s}{c_w} + f_{wm} f_{sm} \frac{c_s}{c_w} + f_{wm} f_{ws}} \nabla P +$$

$$+ \frac{f_{sm} \frac{c_s}{c_w}}{f_{ws} f_{sm} \frac{c_s}{c_w} + f_{wm} f_{sm} \frac{c_s}{c_w} + f_{wm} f_{ws}} \nabla \pi_s$$

(3.53)

$$c_s(\vec{v}_s - \vec{v}_m) = - \frac{f_{ws}(c_s v_s + c_w v_w) + f_{wm} c_s v_s}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} f_{sm} + f_{wm} f_{ws} \frac{c_w}{c_s}} \nabla P -$$

$$- \frac{f_{wm} - f_{sm} \frac{c_s}{c_w}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} f_{sm} + f_{wm} f_{ws} \frac{c_w}{c_s}} \nabla \pi_s$$

Як відомо з векторного аналізу, похідна за часом t від інтегралу за об'ємом $V(t)$, що змінюється з часом, дорівнює

$$\frac{d}{dt} \int_{V(t)} \rho \phi dV = \int_{V(t)} \rho \frac{d\phi}{dt} dV - \int_{S(t)} \rho \phi (\vec{v} - \vec{v}_m) d\vec{S}$$

де ρ - щільність системи,

$d\vec{S} = dS\vec{n}$ (dS – елемент площі поверхні, що обіймає об'єм V , $\vec{n}$ – орт зовнішньої нормалі до цієї поверхні),

φ - довільна функція координат і часу.

При $\varphi = \nu$ (ν - питомий об'єм системи) з урахуванням рівняння безперервності

$$\rho \frac{d\nu}{dt} = \text{div} \vec{v}$$

і теореми Гауса отримуємо

$$\frac{dV}{dt} = \int_{S(t)} \vec{v}_m d\vec{S}$$

При $\varphi = c_k$ з урахуванням рівняння балансу маси k -го компонента, теореми Гауса та у відсутності хімічних реакцій

$$\frac{dN_k}{dt} = - \int_{S(t)} c_k (\vec{v}_k - \vec{v}_m) d\vec{S} \quad (3.54)$$

де N_k – число молів k -ої речовини у внутрішньоклітинному розчині.

Очевидно,

$$\frac{dV}{dt} = \sum_{k=1}^n \frac{d(N_k \nu_k)}{dt} = \sum_{k=1}^n \nu_k \frac{dN_k}{dt} \quad (3.55)$$

оскільки парціальний питомий об'єм k -го компонента ν_k в рідинах практично не змінюється з часом.

З (3.53)-(3.55) витікає

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt} N_w = & -S \left\{ \frac{c_w}{c_s} \frac{c_s \nu_w f_{sm} + (c_w \nu_w + c_s \nu_s) f_{ws}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + \frac{c_w}{c_s} f_{ws} \right)} \right\} \frac{\Delta P}{h} + \\
& + S \left\{ \frac{f_{sm}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + \frac{c_w}{c_s} f_{ws} \right)} \right\} \frac{\Delta \pi_s}{h}
\end{aligned} \tag{3.56}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt} N_s = & -S \left\{ \frac{(c_w \nu_w + c_s \nu_s) f_{ws} + c_s \nu_s f_{wm}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + \frac{c_w}{c_s} f_{ws} \right)} \right\} \frac{\Delta P}{h} - \\
& - S \left\{ \frac{f_{wm}}{f_{ws} f_{sm} + f_{wm} \left(f_{sm} + \frac{c_w}{c_s} f_{ws} \right)} \right\} \frac{\Delta \pi_s}{h}
\end{aligned} \tag{3.57}$$

$$\begin{aligned}
\frac{d}{dt} V = & S \left\{ \frac{(c_w \nu_w + c_s \nu_s)^2 f_{ws} + (c_s \nu_s)^2 f_{wm} + c_s c_w \nu_w^2 f_{sm}}{c_s \left[(f_{ws} f_{sm} + f_{wm} f_{sm}) + \frac{c_w}{c_s} f_{wm} f_{ws} \right]} \right\} \frac{\Delta P}{h} + \\
& + S \left\{ \frac{f_{wm} \nu_s - f_{sm} \nu_w}{(f_{ws} f_{sm} + f_{wm} f_{sm}) + \frac{c_w}{c_s} f_{wm} f_{ws}} \right\} \frac{\Delta \pi_s}{h}
\end{aligned} \tag{3.58}$$

де ΔP і $\Delta \pi_s$ – перепади гідростатичного тиску і осмотичного тиску s -ої речовини на мембрані між її внутрішньою і зовнішньою поверхнями,

h – товщина клітинної мембрани,

фігурні дужки означають усереднення величини, яку вони обіймають, за об'ємом мембрани.

Перепад $\Delta \pi_s$ пов'язаний з перепадом осмотичного тиску між внутрішньоклітинним і позаклітинним розчинами π_s^{in} - π_s^{out} таким чином

$$\Delta \pi_s = K_s (\pi_s^{in} - \pi_s^{out}) \quad (3.59)$$

де K_s – коефіцієнт розподілу s -ої речовини між мембраною та оточуючими її розчинами.

За визначенням коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани

$$L_p = \left(\frac{\frac{d}{dt} V}{S \Delta P} \right)_{\Delta \pi_s = 0} \quad (3.60)$$

Коефіцієнт проникності клітинної мембрани до s -ої речовини

$$\omega_s = \left(\frac{\frac{d}{dt} N_s}{S \Delta \pi_s} \right)_{\Delta P = 0} \quad (3.61)$$

і коефіцієнт відбиття клітинної мембрани для s -ої речовини є

$$\sigma_s = \left(\frac{\Delta \pi_s}{\Delta P} \right)_{\frac{d}{dt} V=0} \quad (3.62)$$

З рівнянь (57) і (58) з урахуванням визначень (59)-(62) отримуємо вирази для транспортних коефіцієнтів мембрани через коефіцієнти тертя, а саме

$$L_p = \frac{1}{h} \frac{c_w v_w^2 \left[1 + \frac{f_{sw} \left[\left(\frac{c_s v_s}{c_w v_w} \right)^2 + 2 \frac{c_s v_s}{c_w v_w} \right] + f_{wm} \frac{c_s v_s^2}{c_w v_w^2}}{f_{sw} + f_{sm}} \right]}{f_{wm} + \frac{f_{sw} f_{sm}}{f_{sw} + f_{sm}} \frac{c_s}{c_w}} \quad (3.63)$$

$$\omega_s = \frac{1}{h} \frac{K_s}{f_{sm} + f_{sw}} \left[\frac{f_{wm}}{f_{wm} + \frac{f_{sm} f_{sw}}{f_{sm} + f_{sw}} \frac{c_s}{c_w}} \right] \quad (3.64)$$

$$\sigma_s = 1 - \frac{\omega_s v_s}{L_p} - \frac{\omega_s f_{sw} h \left[1 + \frac{f_{sm} f_{sw}}{f_{wm} (f_{sm} + f_{sw})} \frac{c_s}{c_w} \right]}{1 + \frac{f_{sw}}{f_{sm} + f_{sw}} \left(2 \frac{c_s v_s}{c_w v_w} + \frac{c_s^2 v_s^2}{c_w^2 v_w^2} \right) + \frac{f_{wm}}{f_{sm} + f_{sw}} \frac{c_s v_s^2}{c_w v_w^2}} + \quad (3.65)$$

$$\frac{K_s \left[\frac{f_{sm}}{f_{sm} + f_{sw}} \frac{1 - c_w v_w}{c_w v_w} - \frac{f_{sw}}{f_{sm} + f_{sw}} \left(2 \frac{c_s v_s}{c_w v_w} + \frac{c_s^2 v_s^2}{c_w^2 v_w^2} \right) - \frac{f_{wm}}{f_{sm} + f_{sw}} \frac{c_s v_s^2}{c_w v_w^2} \right]}{1 + \frac{f_{sw}}{f_{sm} + f_{sw}} \left(2 \frac{c_s v_s}{c_w v_w} + \frac{c_s^2 v_s^2}{c_w^2 v_w^2} \right) + \frac{f_{wm}}{f_{sm} + f_{sw}} \frac{c_s v_s^2}{c_w v_w^2}}$$

Для високо селективних мембран, якими є клітинні мембрани

$$f_{sm} \geq f_{wm} \gg f_{sw}$$

Тому

$$\omega_s \approx \frac{1}{h} \frac{K_s}{f_{sm}}, \quad L_p \approx \frac{1}{h} \frac{c_w v_w^2}{f_{wm}}$$

$$\sigma_s = 1 - \frac{v_s K_s f_{wm}}{c_w v_w^2 (f_{sm} + f_{sw})} \quad (3.66)$$

Для пори $f_{sm} \gg f_{sw}$, $c_w v_w \ll 1$ і $K_s=1$, так що

$$\sigma_s = 1 - \frac{v_s f_{wm}}{v_w f_{sm}}$$

Вирази (3.66) подібні до класичних виразів, отриманих в роботі Kedem, Katchalsky [197]. Але, наш результат (3.63-3.65) одержано для більш загального випадку. На відміну від авторів цієї роботи, ми розглянули замкнуту рухому, а не нерухому безмежну плоску мембрану. Одержані нами вирази для транспортних характеристик мембран є більш адекватні для застосування до реальних клітин. Оскільки співвідношення між коефіцієнтами тертя, які мають прозорий фізичний сенс, із загальноновживаними феноменологічними коефіцієнтами широко використовуються для інтерпретації експериментальних даних щодо проникності біологічних мембран важливо було отримати ці вирази за більш загальних припущень.

3.3. Висновки

Практично у всіх роботах, присвячених вивченню пасивної проникності біологічних мембран використовуються рівняння Кедем-Качальського. Ключовим пунктом, з якого вони витікають, є вираз для виробництва ентропії, яка виникає при пасивному масопереносі крізь вибірково проникну мембрану. З іншого боку, для трактування результатів щодо пасивного масопереносу часто використовуються зв'язки між загальноприйнятими транспортними характеристиками біологічних мембран і коефіцієнтами взаємного тертя між окремими компонентами системи. Тому було принципово важливим отримати аналогічні вирази за більш загальних, ніж це припускалось в роботах Кедем і Качальського, умовах. В цьому напрямку нами отримано два важливих результати. По-перше, вираз для виробництва ентропії в системі “замкнута вибірково проникна мембрана – багатокомпонентний розчин” виведено нами з урахуванням рівнянь руху окремих компонентів розчину. Дотепер для цього використовували рівняння Нав'є-Стокса для однокомпонентної рідини, що було недостатньо аргументовано та викликало деякі сумніви і дискусію. Очевидно, що у випадку розгляду процесів гіпотонічного гемолізу внаслідок масопереносу проникаючої крізь клітинну мембрану речовини використання отриманих нами за більш загальних умов рівнянь є більш обґрунтованим.

По-друге, на відміну від Кедем і Качальського, які отримали співвідношення між загальноприйнятими транспортними характеристиками біомембран і коефіцієнтами тертя, розглядаючи одновимірну дифузію крізь плоску необмежену нерухому вибірково проникну мембрану, ми одержали аналогічні співвідношення для випадку замкнутої рухомої вибірково проникної мембрани довільної форми, що більш адекватно відображає реальну картину процесів, що досліджуються.

РОЗДІЛ 4

**ФІЗИКО-МАТЕМАТИЧНА МОДЕЛЬ ГІПОТОНІЧНОГО
ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ У ВОДНОМУ РОЗЧИНІ
ПРОНИКАЮЧОЇ В КЛІТИНИ РЕЧОВИНИ**

**4.1. Кінетика зміни об'єму еритроцита у водному розчині
проникаючої речовини**

Як було зазначено в розділі 1, зміна об'єму клітини і внутрішньоклітинної концентрації проникаючої в клітину речовини описується системою звичайних диференціальних рівнянь (1.2). При переході до безрозмірних величин отримуємо:

$$\frac{d}{dt} y = \frac{1}{\tau_0} \left[\sigma_s \Delta \hat{\pi}_s + \Delta \hat{\pi}_p - \frac{\Delta P}{\pi_0} \right] \quad (4.1)$$

$$\frac{d}{dt} \hat{\pi}_s^{in} = - \left[\frac{1}{\tau_1} \Delta \pi_s + \sigma_s \hat{\pi}_s^{in} \frac{dy}{dt} \right] \frac{1}{y - \alpha}$$

де $y = V/V_o$ – відносний об'єм клітини

V і V_o – поточне та початкове значення об'єму клітини

σ_s – коефіцієнт відбиття клітинної мембрани для проникаючої в клітину речовини,

$$\Delta \hat{\pi}_s = \frac{\Delta \pi_s}{\pi_0},$$

$$\frac{1}{\tau_0} \equiv \mathcal{L}_p \pi_0,$$

$$\frac{1}{\tau_1} \equiv \gamma K,$$

π_s – осмотичний тиск проникаючої речовини,

π_0 – осмотичний тиск не проникаючих крізь клітинну мембрану внутрішньоклітинних речовин в початковий момент часу, тобто фізіологічного розчину,

γ - відношення площі поверхні клітинної мембрани до об'єму клітини в початковому стані,

L_p – коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани,

K – коефіцієнт проникності клітинної мембрани для проникаючої речовини.

При пасивному переносі молекул води крізь клітинну мембрану коефіцієнт відбиття пов'язаний з коефіцієнтом фільтрації клітинної мембрани таким чином [198]

$$1 - \sigma_s = \varepsilon n_0 \mathcal{V} \quad (4.2)$$

де $\varepsilon = \tau_0 / \tau_1$,

$n_0 = \pi_0 / RT$,

$\mathcal{V}$ – молярний об'єм проникаючої крізь клітинну мембрану речовини,

R – універсальна газова постійна,

T – абсолютна температура.

Величини τ_0 і τ_1 мають розмірність часу і відповідно являються характерним часом встановлення хімічної рівноваги на мембрані клітини для молекул розчинника (води) та розчиненої речовини. Для еритроцитів людини $\varepsilon \leq 0,001$ і відповідно $\sigma \approx 1$.

Якщо початкове значення об'єму клітини задовольняє нерівності

$$V_0 \leq \frac{1}{6\sqrt{\pi}} S_0^{\frac{3}{2}} \quad (S_0 - \text{площа недеформованого еритроцита}), \text{ то до того часу,}$$

поки відносний об'єм клітини буде знаходитись в інтервалі

$$1 \leq y \leq y_s = \frac{S_0^{\frac{3}{2}}}{6\sqrt{\pi}V_0} \quad (4.3)$$

перепадом тиску на клітинній мембрані можна знехтувати, оскільки клітинна мембрана при цьому не зазнає ізотропного розтягу [15, с.102]. Коли ж клітина стає сферичною і відносний об'єм клітини перевищує значення y_s , клітинна мембрана розтягується і всередині клітини утворюється додатковий тиск. У відповідності до формули, яка є аналогічною до формули Лапласа для рідини, перепад тиску на мембрані ΔP пов'язаний з її ізотропним натягом σ таким чином:

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R_s},$$

де $R_s = \sqrt{\frac{S_0}{4\pi}}$ - радіус недеформованого сфероцита.

Беручи до уваги закон Гука

$$\sigma = \Gamma \left(\frac{S - S_0}{S_0} \right) \quad (4.4)$$

де S – площа поверхні ізотропно розтягнутої клітинної мембрани,

S_0 – площа поверхні клітинної мембрани в недеформованому стані,

Γ – модуль ізотропного розтягу мембрани еритроцита,

отримуємо

$$\Delta P = \frac{2\Gamma}{R_s} \left(\frac{S}{S_0} - 1 \right)$$

Оскільки $S=4\pi R^2$, $S_0=4\pi R_s^2$,

$$\Delta P = \frac{2\Gamma}{R_s} \left(\frac{R^2}{R_s^2} - 1 \right) = \frac{2\Gamma}{R_s} \left[\left(\frac{V}{V_s} \right)^{\frac{2}{3}} - 1 \right] = \frac{2\Gamma}{R_s} \left[\left(1 + \frac{y - y_s}{y_s} \right)^{\frac{2}{3}} - 1 \right]$$

Таким чином [15,с.97]

$$\frac{\Delta P}{\pi_0} = C \left[\left(\frac{y}{y_s} \right)^{\frac{2}{3}} - 1 \right] \quad (4.5)$$

$$\text{де } C = \frac{4\Gamma\sqrt{\pi}}{\sqrt{S_0}\pi_0}$$

Відомо [185], що розрив мембрани еритроцита виникає при невеликій відносній зміні площі поверхні його мембрани та, відповідно, при невеликій зміні його відносного об'єму. Тому, при описанні зміни об'єму клітини в межах $y_s < y < y_p$, де y_p – значення відносного об'єму клітини, при якому в її ізотропно розтягнутій мембрані виникає макроскопічна пора, можна вважати, що

$$(y - y_s)/y_s \ll 1 \quad \Delta P/\pi_0 = 2C(y/y_s - 1)/3 \quad (4.6)$$

Точне аналітичне рішення системи нелінійних рівнянь (4.1), що описують процеси масопереносу в системі з одною проникаючою речовиною в позаклітинному середовищі, отримати неможливо. Тому для визначення коефіцієнтів проникності клітинних мембран за експериментальним ходом зміни об'єму клітини ці рівняння, як правило, вирішують чисельно за допомогою ЕОМ. Це утруднює як аналіз результатів відповідних чисельних експериментів, так і зіставлення чисельних експериментів з експериментальними даними. Проте, можна отримати більш ефективно та зручне для аналізу рішення системи рівнянь (4.1) за допомогою асимптотичних методів рішення сингулярно збурених систем [188]. Для

цього з урахуванням наведених вище співвідношень та визначень подамо систему рівнянь (4.1) у вигляді

$$\varepsilon \frac{dy}{dt^*} = \sigma_s \Delta \hat{\pi}_s + \hat{\pi}_p^{in} - \frac{2}{3} \frac{C(y - y_s)}{y_s} \quad (4.7)$$

$$\frac{dz'}{dt^*} = -\frac{z'}{y - \alpha} + \hat{\pi}' + \varepsilon \hat{\pi}_s^{in} \frac{dy}{dt^*}$$

де введено безрозмірний “повільний” час $t^* = \frac{t}{\tau_1}$ і нову змінну

$$z' = (y - \alpha) \hat{\pi}_s^{in} \text{ і } \hat{\pi}' = \pi' / \pi_0,$$

де π' - осмотичний тиск позаклітинного розчину,

$\Delta \hat{\pi}_p^{in} = \pi_p^{in} / \pi_0$ - приведений осмотичний тиск не проникаючих крізь мембрану внутрішньоклітинних речовин.

Очевидно, $\hat{\pi}_p^{in} = \frac{1 - \alpha}{y - \alpha}$. Оскільки в якості співмножника при похідній $\frac{dy}{dt^*}$

фігурує малий параметр ε , можна отримати асимптотичне рішення системи рівнянь (4.1) для часів $t_0 \gg t \approx 10^{-2}$ с за допомогою згаданого вище метода сингулярних збурень. Вважаючи в (4.7) $\varepsilon = 0$ після нескладних перетворень отримуємо так звану систему породжуючих рівнянь, порядок якої знижений на одиницю в порівнянні з вихідною

$$\sigma_s z + 1 - \alpha = (y - \alpha) \left[\sigma_s \hat{n}' + \frac{2}{3} \frac{C(y - y_s)}{y_s} \right] \quad (4.8)$$

$$\frac{dz}{dt^*} = \frac{(1 - \alpha) \hat{n}'}{\sigma_s z + 1 - \alpha}$$

де $z=z'/RT$,

$n'=\pi'/RT$,

$\hat{n}'=n'/n_0$

Рішення (4.8), тобто рішення (4.7) в несингулярній області, при $\Delta P=0$ і за початкової умови $z(0)=0$, є

$$(\sigma_s \hat{n}')^2 (y - \alpha)^2 - (1 - \alpha)^2 = 2(1 - \alpha) \sigma_s \hat{n}' t^* \quad (4.9)$$

За допомогою (4.9) час досягнення клітиною сферичного об'єму y_s визначається як

$$t_s = \frac{(\sigma_s \hat{n}')^2 (y_s - \alpha)^2 - (1 - \alpha)^2}{2\gamma K(1 - \alpha) \sigma_s \hat{n}'} \quad (4.10)$$

Зміна відносного об'єму клітини за умови $y > y_s$ в несингулярній області описується рішенням системи рівнянь (4.7) при $\Delta P \neq 0$ за початкової умови $y(t_s) = y_s$. Це рішення має вигляд

$$\begin{aligned} t^* - t_s = & 2(y - y_s) - \frac{2C'(y_s - \alpha) + 3\sigma_s \hat{n}'}{4C'} \times \ln \left\{ 1 - \frac{2C'}{3(1 - \alpha)} [(y - \alpha)^2 - (y_s - \alpha)(y - \alpha)] \right\} + \\ & + \frac{2C'(y_s - \alpha)^2 + 3\sigma_s \hat{n}'(y_s - \alpha) + 12(1 - \alpha)}{4\sqrt{C'}\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)}} \times \ln \left\{ \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} + 2\sqrt{C'}(y - y_s/2 - \alpha/2)}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} - 2\sqrt{C'}(y - y_s/2 - \alpha/2)} \times \right. \\ & \left. \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} - \sqrt{C'}(y_s - \alpha)}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} + \sqrt{C'}(y_s - \alpha)} \right\} \end{aligned} \quad (4.11)$$

де $C'=C/y_s$.

Рішення (4.9) та (4.11) описують зміну відносного об'єму клітини з часом після її вміщення в гіпертонічний водний розчин проникаючої в клітину речовини. В несингулярній області, тобто за часів, що перевищують τ_0 , ці рішення з точністю до членів порядку $O(\varepsilon)$ апроксимують точне рішення системи рівнянь (4.1)

4.2. Фізико-математична модель флуктуаційного утворення пори в ізотропно розтягнутій мембрані еритроцита

В роботі [13] і в нашій роботі [14] побудована теорія осмотичного лізису ліпідних везикул, що виникає внаслідок флуктуаційного утворення макроскопічної пори в розтягнутому мембранному бішарі. Вільна енергія деформації ізотропно розтягнутої клітинної мембрани становить

$$F = \frac{1}{2} \sigma (S - S_0) = \frac{\Gamma}{2} \frac{(S - S_0)^2}{S_0} \quad (4.12)$$

де ізотропний натяг σ визначається двовірним аналогом закону Гука (4.4)

Якщо в ізотропно розтягнутій мембрані утворюється кругла макроскопічна пора радіуса a , то це, з одного боку, приведе до зниження ізотропного натягу мембрани до величини

$$\sigma = \Gamma \left(\frac{\Delta S - \pi a^2}{S_0} \right) \quad (4.13)$$

і відповідно до зниження вільної енергії її деформації. З іншого боку, утворення макроскопічної пори в мембрані збільшує вільну енергію деформації клітинної мембрани на величину $W_0 + 2\pi a \gamma_0$, що пов'язано з

необхідністю витратити додаткову роботу на утворення границі пори з рештою мембрани, яка характеризується лінійним натягом пори γ_0 . Величина W_0 представляє собою енергію, яка повинна бути витрачена на утворення пори з нульовим радіусом.

З урахуванням обох згаданих ефектів вільна енергія деформації ізотропно розтягнутої мембрани, в якій є кругла пора радіуса a , набуває вигляду

$$F = \frac{\Gamma}{2} \frac{(S - S_0 - \pi a^2)^2}{S_0} + 2\pi a \gamma_0 + W_0 \quad (4.14)$$

або

$$F = 2\pi R_s^2 \Gamma \left[(-x^2 + Y)^2 + 4Ax \right] + W_0 \quad (4.15)$$

де $R_s = \frac{1}{2} \left(\frac{S_0}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}}$ - радіус мембрани сфероцита у відсутності деформацій,

$$x \equiv \frac{a}{2R_s},$$

$$A \equiv \frac{\gamma_0}{2R_s \Gamma},$$

$$Y \equiv \left(\frac{R}{R_s} \right)^2 - 1$$

і припускається, що $\pi a^2 \ll S_0$.

За невеликих значеннях розтягу $Y < 3 \left(\frac{A}{2} \right)^{\frac{2}{3}}$ $F(a)$ монотонно

збільшується зі збільшенням радіуса пори (рис. 4.1, крива 1). Тобто, у відповідності до відомого в термодинаміці принципу мінімуму вільної енергії при зазначених невеликих розтягах утворення макроскопічної пори в

ізотропно розтягнутій мембрані є енергетично не вигідним. Коли розтяг мембрани набуває значення $Y = Y^* = 3\left(\frac{A}{2}\right)^{\frac{2}{3}}$ на залежності вільної енергії деформації мембрани від радіуса пори a виникає точка перегину А, дотична в якій є паралельна осі абсцис. Розтяг мембрани Y^* , при якому на графіку $F=F(a)$ з'являється точка перегину А, назовемо критичним. Коли ж розтяг мембрани Y перевищує це критичне значення, на залежності вільної енергії деформації від радіуса мембранної пори виникає локальний мінімум при деякому, відмінному від нуля, значенні пори a_{min} (рис.4.1, крива 4).

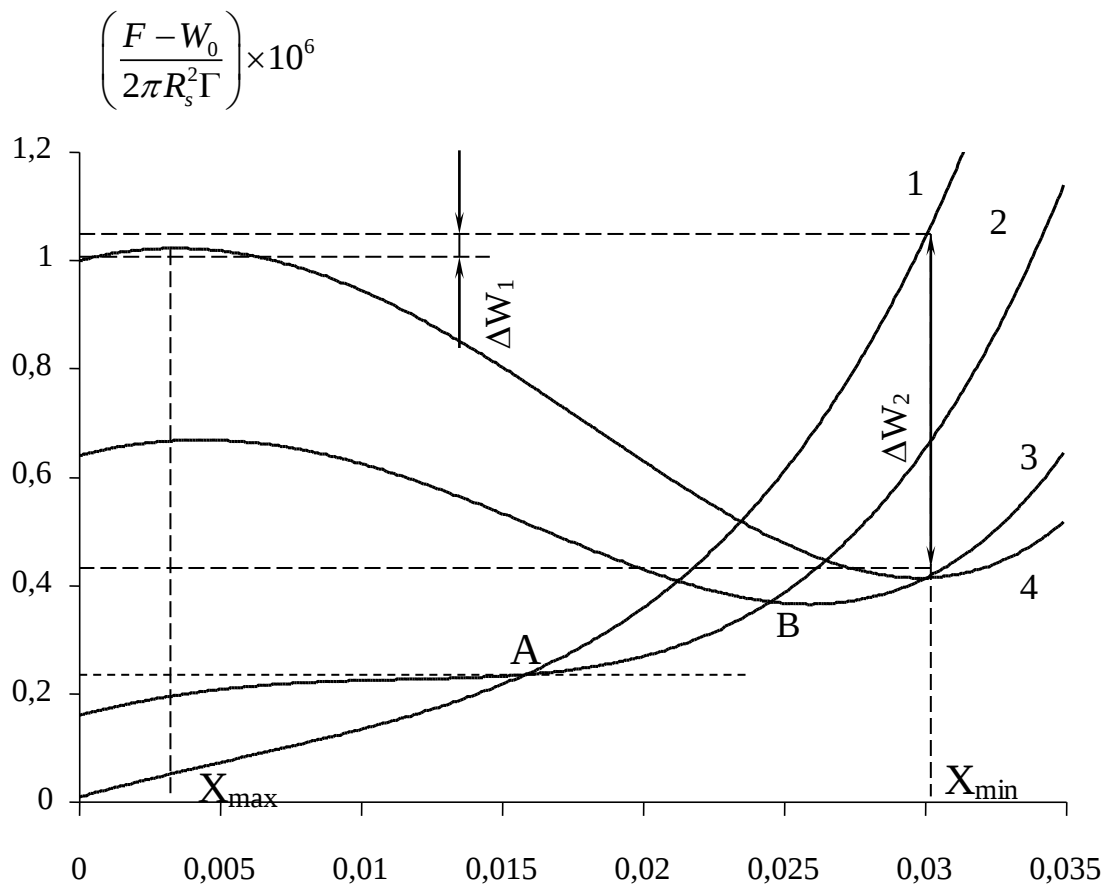


Рис. 4.1. Залежність вільної енергії деформації ізотропно розтягнутої мембрани від радіусу макроскопічної мембранної пори за різних розтягів: 1 – $Y = 10^{-4}$; 2 – $Y = 4 \cdot 10^{-4}$; 3 – $Y = 8 \cdot 10^{-4}$; 4 – $Y = 10^{-3}$

Якщо розтяг мембрани в декілька разів перевищує критичний, то значення вільної енергії в зазначеному локальному мінімумі стає меншим, ніж значення енергії деформації мембрани у відсутності пори. В цьому випадку утворення макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані у відповідності з принципом мінімуму вільної енергії стає енергетично вигідним, і, в решті решт, пора обов'язково утвориться. Але для утворення пори дана система повинна за рахунок теплових флуктуацій подолати енергетичний бар'єр $W_0 + \Delta W_1$ (рис.4.1). Зворотний же перехід потребує подолання енергетичного бар'єра ΔW_2 . Для того, щоб розрахувати величини цих бар'єрів, відшукаємо спочатку значення аргументів x_{max} та x_{min} , що відповідають максимуму та мінімуму вільної енергії деформації ізотропно розтягнутої мембрани для випадку

$$Y \gg Y^* = 3 \left(\frac{\gamma}{4R_s \Gamma} \right)^{\frac{2}{3}} \quad (4.16)$$

Необхідною умовою існування локального екстремуму функції $F=F(x)$ є

$$\frac{dF}{dx} = 8\pi R_s^2 [x^3 - Yx + A] = 0 \quad (4.17)$$

Тому, для визначення шуканих значень a_{min} і a_{max} знаходимо наближені з точністю до малих величин другого порядку відносно малого параметру Y/Y^* позитивні корені кубічного рівняння (4.17):

$$x_{max} = \frac{a_{max}}{2R_s} = \frac{A}{Y}$$

$$x_{min} = \frac{a_{min}}{2R_s} = \sqrt{Y} \left[1 - \frac{1}{2} \frac{A}{Y^{\frac{3}{2}}} \right] \quad (4.18)$$

Перший з відшуканих коренів відповідає максимуму, а другий – мінімуму. Підставляючи знайдені значення координат максимуму і мінімуму в (4.15), знаходимо $F(x_{max})$ і $F(x_{min})$, і з урахуванням (4.16) отримуємо висоти бар'єрів:

$$\Delta W_1 = F(x_{max}) - F(0) = \frac{\pi\gamma_0^2}{\sigma} \left(1 + \frac{1}{2} \frac{A^2}{Y^2} \right) + W_0 \approx \frac{\pi\gamma_0^2}{\sigma} + W_0 = \frac{\pi\gamma_0^2}{\Gamma Y} \quad (4.19)$$

$$\Delta W_2 = \frac{2\pi R_s^2}{\Gamma} \sigma^2 \quad (4.20)$$

З (4.19) та (4.20) витікає, що зі збільшенням розтягу мембрани висота бар'єра ΔW_1 знижується, а висота бар'єра ΔW_2 підвищується.

З теорії випадкових марковських процесів відомо, що середній час переходу $\langle t \rangle(a)$ системи зі стану a , що розташований поблизу від локального мінімуму 1 на вершину бар'єра 2, який відділяє 1 від іншого мінімуму 3 (див. рис.4.1), задовольняє так званому другому рівнянню Понтрягіна

$$\frac{d^2 \langle t \rangle}{da^2} - \frac{1}{kT} \frac{dF}{da} \frac{d \langle t \rangle}{da} + \frac{1}{D(a)} = 0 \quad (4.21)$$

з граничними умовами

$$\langle t \rangle(a_1) = 0, \quad \frac{d}{da} \langle t \rangle(0) = 0 \quad (4.22)$$

де D – коефіцієнт дифузії в просторі розмірів пори.

Рішення рівняння (4.21) з граничними умовами (4.22) є

$$\langle t_p \rangle = \frac{(kT)^{\frac{3}{2}}}{D\gamma_0 2\pi R_s^2 \sqrt{\sigma}} \exp\left(\frac{W_0}{kT}\right) \exp\left[\frac{\pi\gamma_0^2}{kT\sigma}\right] \quad (4.23)$$

або

$$\langle t_p \rangle = A' \sigma^{-1/2} \exp \left[\frac{\pi \gamma_0^2}{kT \sigma} \right] \quad (4.24)$$

де A' – передекспоненційний множник, що не залежить від натягу мембрани σ .

З урахуванням закону Гука

$$\sigma = \frac{2}{3} \Gamma \left(\frac{y}{y_s} - 1 \right) \quad (4.25)$$

Тому (4.24) можна подати у вигляді

$$\langle t_p \rangle = A'' (y - y_s)^{-1/2} \exp \left[\frac{3\pi \gamma_0^2}{kTR_s \pi_0 C' [y - y_s]} \right] \quad (4.26)$$

Середній час, за який утворюється макроскопічна пора в ізотропно розтягнутій мембрані, є тим більшим, чим менше розтяг мембрани і чим нижча температура, при якій утворюється пора.

Експериментальні дані, подані на рис. 4.2, отримані в роботі [199] методом втягування поодиноких еритроцитів в піпетку з каліброваним діаметром при фіксованому перепаді тиску. Виходячи з геометрії деформованого таким чином еритроцита і фіксованого перепаду всмоктуючого тиску, легко розраховувався ізотропний натяг мембрани, за якого візуально спостерігався вихід гемоглобіну з еритроцита. Підкреслимо, що в цих експериментах, як і за контакту клітин з гіпотонічним розчином, визначальний внесок в енергію деформації надає ізотропний натяг мембрани еритроцита, у зв'язку з чим порівняння отриманих в [199] експериментальних даних із залежностями, розрахованими нами (у припущенні ізотропного натягу), є правомірними.

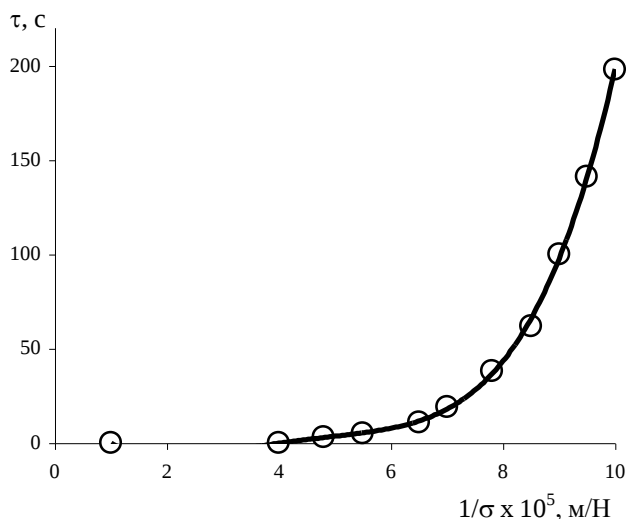


Рис. 4.2. Експериментальна залежність часу гемолізу (о) і теоретична залежність середнього часу флуктуаційного утворення мембранної пори (—) від оберненої величини натягу мембрани

Ототожнюючи час настання гемолізу еритроцита в зазначених експериментах із середнім часом утворення макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані клітин, котрий надається виразом (4.26), можна

визначити константи A'' і $B = \frac{3\pi\gamma_0^2}{kTR_s\pi_0}$ у виразі для середнього часу утворення

макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані. Зіставлення теорії з експериментом дає $A''=0.01$, $B=0.08676$. Отримане таким чином значення B відповідає коефіцієнту лінійного натягу пори $\gamma_0=10^{-11}$ Н, що узгоджується з відомими з літератури даними [13]. Значення ж коефіцієнту дифузії в просторі розмірів пори (при нульовому радіусі пори за кімнатної температури) виявляється рівним $D \cong 2 \cdot 10^{-11}$ м²/с.

Після утворення в мембрані пори радіуса

$$a \approx 2R_s \sqrt{Y} \left(1 - \frac{A}{\frac{3}{2Y^2}} \right)$$

її натяг у відповідності з (4.13) падає до значення $\sigma = \gamma/a$, а трансмембранний перепад тиску - до значення

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R_s} = \frac{2\gamma_0}{aR_s} \quad (4.27)$$

Співвідношення (4.28) між радіусом пори і перепадом тиску на мембрані залишається незмінним аж до флуктуаційного “заліковування” пори.

Безпосередньо використовувати формулу (4.26) для описання гіпотонічного гемолізу не можна, оскільки об’єм клітини, а разом з ним і ізотропний натяг мембрани (за умови $y > y_s$) у випадку, що розглядається, безперервно збільшується з часом, а не лишається постійним. Проте, можна вважати, що макроскопічна пора утворюється в мембрані, якщо час, протягом якого відносний об’єм клітини знаходиться в інтервалі значень Δy , дорівнює середньому часу утворення макроскопічної пори, що відповідає деякому значенню y , яке лежить в цьому інтервалі за формулою (4.26). В аналітичному вигляді це твердження можна подати таким чином

$$\int_{y^*}^{y_p} \frac{dt}{dy} dy = \frac{1}{y_p - y^*} \int_{y^*}^{y_p} \langle t_p \rangle dy \quad (4.28)$$

де y_p - відносний об’єм клітини, при якому в мембрані утворюється пора,

y^* - відносний об’єм клітини, що визначається рівністю $t(y) - t_s = \langle t_p \rangle(y)$.

Нехай $t(y^*) = t^*$ і t_p - є момент часу, у який утворюється мембранна пора у нестационарному випадку. Експерименти показують [185], що $t_p - t_s \ll t_s$. Оскільки також $y_p - y^* \ll y^* \approx y_s$, за умови $y^* \leq y \leq y_p$ маємо

$$\langle t_p \rangle(y) = \langle t_p \rangle(y^*) + \left(\frac{d\langle t_p \rangle}{dy} \right)^* (y - y^*)$$

і

$$y - y^* = \left(\frac{dy}{dt} \right)^* (t - t^*)$$

де зірочками позначені величини, які взяті за $y = y^*$. З урахуванням двох останніх рівностей умову (4.28) можна подати у вигляді

$$y_p = y^* + \langle t_p \rangle^* \frac{\left(\frac{dy}{dt} \right)^*}{1 - \frac{1}{2} \left(\frac{d\langle t_p \rangle}{dy} \right)^* \left(\frac{dy}{dt} \right)^*} \quad (4.29)$$

Диференціюючи [4.11] та [4.26], знаходимо

$$\left(\frac{dy}{dt} \right)^* = \gamma K \frac{[3(1-\alpha)] - 2C'(y^* - y_s)(y^* - \alpha)}{(y^* - \alpha)[3\sigma\hat{n}' + 2C'(2y^* - y_s - \alpha)]} \quad (4.30)$$

і

$$\left(\frac{d\langle t_p \rangle}{dy} \right)^* = -\langle t_p \rangle^* \left(\frac{3\pi\gamma_0^2}{kTR_s\pi_0 C'(y - y_s)^2} \right) \quad (4.31)$$

З урахуванням (4.30) і (4.31) отримуємо для значень відносного об'єму клітини і часу, за яких в клітинній мембрані утворюється макроскопічна пора, такі вирази

$$y_p = y^* + \langle t_p \rangle^* \gamma K \frac{[3(1-\alpha) - 2C'(y^* - y_s)(y^* - \alpha)]}{(y^* - \alpha)[3\sigma\hat{n}' + 2C'(2y^* - y_s - \alpha)]} \times$$

$$\times \frac{1}{1 + \frac{1}{2} \langle t_p \rangle^* \gamma K \frac{3\pi\gamma_0^2 [3(1-\alpha) - 2C'(y^* - y_s)(y^* - \alpha)]}{kTR_s \pi_0 C'(y^* - y_s)^2 (y^* - \alpha) [3\sigma\hat{n}' + 2C'(2y^* - y_s - \alpha)]}} \quad (4.32)$$

і

$$t_p = t^* + \frac{\langle t_p \rangle^*}{1 + \frac{1}{2} \langle t_p \rangle^* \gamma K \frac{3\pi\gamma_0^2 [3(1-\alpha) - 2C'(y^* - y_s)(y^* - \alpha)]}{kTR_s \pi_0 C'(y^* - y_s)^2 (y^* - \alpha) [3\sigma\hat{n}' + 2C'(2y^* - y_s - \alpha)]}} \quad (4.33)$$

Таким чином, алгоритм розрахунку повного часу, за який в мембрані клітини, що вміщується в гіпертонічний водний розчин проникаючої в неї речовини, виникає макроскопічна пора є таким. Визначаємо відносний об'єм клітини y^* і відповідний йому момент часу t^* , за яких права частина рівняння (4.11), розділена на γK стає рівною правій частині рівняння (4.26). Далі, час, за який в мембрані утворюється макроскопічна пора, визначається за формулою

$$t_p = \frac{[(\sigma \cdot \hat{n}')^2 (y_s - \alpha)^2 - (1 - \alpha)^2]}{2\gamma \cdot K(1 - \alpha)\sigma \cdot \hat{n}'} + \frac{2(y^* - y_s)}{\gamma \cdot K} - \frac{2C'(y_s - \alpha) + 3\sigma \cdot \hat{n}'}{4\gamma \cdot KC'} \times$$

$$\times \ln \left\{ 1 - \frac{2C'}{3(1 - \alpha)} [(y^* - \alpha)^2 - (y_s - \alpha)(y^* - \alpha)] \right\} +$$

$$+ \frac{[2C'(y_s - \alpha)^2 + 3\sigma\hat{n}'(y_s - \alpha) + 12(1 - \alpha)]}{4\gamma \cdot K \sqrt{C'} \sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)}} \times$$

$$\begin{aligned}
& \times \ln \left\{ \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} + 2\sqrt{C'}(y^* - y_s/2 - \alpha/2)}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} - 2\sqrt{C'}(y^* - y_s/2 - \alpha/2)} \right\} \times \\
& \times \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} - \sqrt{C'}(y_s - \alpha)}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} + \sqrt{C'}(y_s - \alpha)} \Bigg\} + \\
& + \frac{\langle t_p \rangle^*}{1 + \frac{1}{2} \langle t_p \rangle^* \gamma K \frac{3\pi\gamma_0^2 [3(1 - \alpha) - 2C'(y^* - y_s)(y^* - \alpha)]}{kTR_s\pi_0 C'(y^* - y_s)^2 (y^* - \alpha) [3\sigma\hat{n}' + 2C'(2y^* - y_s - \alpha)]}} \quad (4.34)
\end{aligned}$$

У відповідності з уявленнями, викладеними у [13-15], крізь макроскопічну пору, що утворилась в ізотропно розтягнутій мембрані еритроцита, відбувається викид внутрішньоклітинного вмісту з клітини назовні під дією залишкового тиску. При цьому тиск всередині клітини швидко падає до критичного значення і відносний об'єм клітини зменшується до значення, що з точністю до малої поправки, якою можна знехтувати, збігається з y_s . В цей момент пора закривається, оскільки її існування стає термодинамічно невигідним (вільна енергія деформації у відсутності пори набуває меншого значення, ніж вільна енергія мембрани з порою). Оскільки при цьому не зникає трансмембранний перепад концентрації проникаючої в еритроцит речовини, процес проникання цієї речовини в клітину продовжується і відповідно об'єм клітини знов збільшується внаслідок його проникання аж до утворення нової пори за описаним механізмом. Таким чином, гемоліз еритроцита є циклічним процесом. Проміжки часу, за які здійснюється викид внутрішньоклітинної речовини крізь пору, як показано в [15], є дуже малими в порівнянні з тривалістю кожного етапу гемолізу від утворення до заліковування чергової мембранної пори, внаслідок чого можна вважати ці проміжки рівними нулю.

Дійсно, коли в ізотропно розтягнутій мембрані еритроцита виникає макроскопічна пора радіуса

$$a_2 = 2R_s \sqrt{Y} \left(1 - \frac{A}{2Y^{\frac{3}{2}}} \right) \quad (4.35)$$

її натяг σ зменшується до значення $\tilde{\sigma}$, але не обертається в нуль. У відповідності до закону Гука

$$\sigma = \Gamma(Y - x^2), \quad \tilde{\sigma} = \Gamma(Y - x_2^2) = \frac{\gamma_0}{2R_s \sqrt{Y}} \quad (4.36)$$

Трансмембранний перепад тиску при цьому зменшується до значення

$$\Delta \tilde{P} = P^{in} - P^{out} = \frac{\gamma_0}{R_s^2 \sqrt{Y}} = \frac{2\gamma_0}{R_s a} \quad (4.37)$$

Як видно з (4.36) та (4.37), залишкові натяг $\tilde{\sigma}$ і перепад тиску $\Delta \tilde{P}$ не обертаються в нуль через наявність лінійного натягу на границі пори, що утворилась в мембрані. Під дією залишкового перепаду тиску (4.37) внутрішньоклітинний розчин як ціле витікає крізь макроскопічну пору з клітини назовні. Об'ємний потік крізь круглий отвір радіуса a , як відомо [187, с.178], дорівнює

$$q_v = a^3 \frac{\Delta \tilde{P}}{3\eta} \quad (4.38)$$

де η - динамічна в'язкість внутрішньоклітинного розчину.

Тому з урахуванням (4.35) і (4.37) отримуємо

$$q_v = \frac{8R_s\gamma_0 Y}{3\eta} = \frac{2\gamma_0 a_2^2}{3\eta R_s} \quad (4.39)$$

З іншого боку, і при наявності пори в мембрані продовжується процес перерозподілу речовин між клітиною і оточуючим її середовищем крізь клітинну мембрану поза порою. З урахуванням обох зазначених процесів рівняння трансмембранного переносу видозмінюються і можуть бути представлені в такому вигляді:

$$\begin{aligned} v \frac{d}{d\hat{t}}(y - \alpha) = v \left[\frac{\sigma_s z}{y - \alpha} - \sigma_s \hat{\pi} + \frac{z_n}{y - \alpha} - \frac{\Delta P}{\pi_0} \right] + v \frac{\Delta P}{\pi_0} S(x - x_{kp}) - \\ - \left[v \frac{\gamma_0}{\pi_0 R_s x} + (1 - \alpha)x^2 \right] S(x - x_{kp}) \\ v \frac{d}{d\hat{t}} z = -v\varepsilon \left(\frac{z}{y - \alpha} - \hat{\pi}' \right) + v\varepsilon \frac{n_0 \mathcal{G}}{y - \alpha} z \frac{d}{d\hat{t}}(y - \alpha) - \\ - (1 - \sigma_s) \frac{z \alpha x^2}{y - \alpha} S(x - x_{kp}) \end{aligned} \quad (4.40)$$

$$v \frac{dz_n}{d\hat{t}} = -\frac{z_n x^2}{y - \alpha} S(x - x_{kp}), \quad v \frac{d\alpha}{d\hat{t}} = \alpha x^2 S(x - x_{kp})$$

де $v = \frac{\tau^*}{\tau_0},$

$$\tau^* = \frac{3\eta V_0}{8R_s \gamma_0},$$

$$z_n = \hat{\pi}_n(y - \alpha),$$

$$\hat{t} = \frac{t}{\tau_0},$$

$$x = a/2R_s,$$

$$x_{кр} = a_{кр}/2R_s,$$

$\hat{\pi}_n$ - осмотичний тиск в нормі не проникаючих крізь клітинну мембрану внутрішньоклітинних речовин,

$S(x-x_{кр})$ – ступінчата функція Хевісайда, що дорівнює нулю при $x < x_{кр}$ і дорівнює одиниці при $x > x_{кр}$,

$a_{кр}$ – радіус пори, після досягнення якого вона заліковується.

При цьому кількість в нормі не проникаючої крізь клітинну мембрану розчиненої речовини і осмотично неактивний внутрішньоклітинний об'єм не є постійними через витік цих компонентів крізь мембранну пору з клітини назовні. Якщо в'язкість внутрішньоклітинного розчину не перевищує 10 сПа, то $\tau^* \leq 1$ мс, і тому $\tau^* \ll \tau_0$. Отже, після закінчення проміжку часу τ^* , тобто практично миттєво, досягається квазістаціонарне рішення системи рівнянь (4.40), при якому $x < x_{кр}$, і, як було показано вище, термодинамічно стійким стає стан мембрани при $x=0$. З математичної ж точки зору рішення $x < x_{кр}$ за $x(0) > x_{кр}$ є асимптотично стійким, оскільки існує позитивно визначена

функція $F = (z^2 + z_n^2)(y - \alpha) + \frac{\alpha^2}{2}$, похідна за часом від якої внаслідок

системи рівнянь збуреного руху (за Ляпуновим) є негативно визначеною [200].

З урахуванням отриманого рішення для часу, за який в мембрані клітини, зануреної в гіпертонічний розчин проникаючої речовини, утворюється макроскопічна пора (4.34), в роботах [201,202] були отримані вирази, які повністю визначають зміну відносного об'єму еритроцита з часом на i -ому етапі гемолізу:

$$\begin{aligned}
\hat{t}^{(i)} = \hat{t}_p^{(i-1)} + \frac{2}{\gamma K} \left[x^{(i)} - x^{(i)}(t_p^{(i-1)}) \right] - \frac{3\sigma\hat{\pi}' + 2C'x_s^{(i)}}{4C'\gamma K} \times \ln \left[\frac{3(1-\alpha)A^{(i)} - 2C'x^{(i)}(x^{(i)} - x_s^{(i)})}{3(1-\alpha)A^{(i)} - 2C'x^{(i)}(t_p^{(i-1)})(x^{(i)}(t_p^{(i-1)}) - x_s^{(i)})} \right] + \\
+ \frac{3\sigma\hat{\pi}'x_s^{(i)} + 2C'x_s^{(i)}x_s^{(i)} + 12(1-\alpha)A^{(i)}}{4\gamma K\sqrt{C'}\sqrt{2C'x_s^{(i)}x_s^{(i)} + 12(1-\alpha)A^{(i)}}} \times \ln \left[\frac{\sqrt{C'x_s^{(i)}x_s^{(i)} + 6(1-\alpha)A^{(i)}} + 2\sqrt{C'}(x^{(i)} - x_s^{(i)}/2)}{\sqrt{C'x_s^{(i)}x_s^{(i)} + 6(1-\alpha)A^{(i)}} - 2\sqrt{C'}(x^{(i)} - x_s^{(i)}/2)} \right] \times \\
\times \frac{\sqrt{C'x_s^{(i)}x_s^{(i)} + 6(1-\alpha)A^{(i)}} - 2\sqrt{C'}(x^{(i)}(t_p^{(i-1)}) - x_s^{(i)}/2)}{\sqrt{C'x_s^{(i)}x_s^{(i)} + 6(1-\alpha)A^{(i)}} + 2\sqrt{C'}(x^{(i)}(t_p^{(i-1)}) - x_s^{(i)}/2)} \right]
\end{aligned}
\tag{4.41}$$

$$\begin{aligned}
\tilde{y}^{(i)} = y_s - \frac{3\sigma\hat{\pi}' + 2C'(y_s - \alpha A^{(i)})}{4C'} + \sqrt{\frac{[3\sigma\hat{\pi}' + 2C'(y_s - \alpha A^{(i)})]^2}{16C'^2} + (y_s - \alpha A^{(i)})(y_p^{(i-1)} - y_s)} \\
i = 1, 2, 3, \dots
\end{aligned}
\tag{4.42}$$

$$\text{де} \quad A^{(i)} = \frac{y_s^i}{\prod_{k=1}^{i-1} y_p^{(k)}},$$

$$x^{(i)} = y^{(i)} - \alpha A^{(i)},$$

$$x_s^{(i)} = y_s^{(i)} - \alpha A^{(i)}$$

$$\tilde{y}^{(i)} = y^{(i)}(t_p^{(i)})$$

На етапі набухання вирази для розрахунку часу і відносного об'єму клітини, за яких в мембрані еритроцита утворюється i -та пора мають вигляд:

$$\begin{aligned}
t_p^{(i)} = t_p + \sum_{k=1}^{i-1} t_p^{(k)} + \frac{\langle t_p^{(i)} \rangle^*}{1 + \frac{\gamma \cdot K \langle t_p^{(i)} \rangle^* 3\pi\gamma_0^2 [3(1-\alpha)A^{(i)} - 2C'(y^{(i)*} - y_s)(y^{(i)*} - \alpha A^{(i)})]}{2kTR_s\pi_0 C'(y^{(i)*} - y_s)^2 (y^{(i)*} - \alpha A^{(i)}) [3\sigma\hat{\pi}' + 2C'(2y^{(i)*} - y_s - \alpha A^{(i)})]}}
\end{aligned}$$

$$i = 1, 2, 3, \dots$$

$$\tag{4.43}$$

$$y_p^{(i)} = y^{(i)*} + \gamma K \langle t_p^{(i)} \rangle \frac{3(1-\alpha)A^{(i)} - 2C'(y^{(i)*} - y_s)(y^{(i)*} - \alpha A^{(i)})}{(y^{(i)*} - \alpha A^{(i)})[3\sigma\pi' + 2C'(2y^{(i)*} - y_s - \alpha A^{(i)})]} \times$$

$$\times \frac{1}{1 + \frac{\gamma K \langle t_p^{(i)} \rangle^* 3\pi\gamma_0^2 [3(1-\alpha)A^{(i)} - 2C'(y^{(i)*} - y_s)(y^{(i)*} - \alpha A^{(i)})]}{2kTR_s\pi_0 C'(y^{(i)*} - y_s)^2 (y^{(i)*} - \alpha A^{(i)}) [3\sigma\pi' + 2C'(2y^{(i)*} - y_s - \alpha A^{(i)})]}} \quad (4.44)$$

Тут $y^{(i)*}$ - значення відносного об'єму клітини, за якого $t^{(i)} = \langle t_p^{(i)} \rangle = \langle t_p^{(i)*} \rangle$, де $t^{(i)}$ визначається рішенням (4.41) з урахуванням умови (4.42), а $\langle t_p^{(i)} \rangle$ збігається з (4.26).

Отримані співвідношення повністю описують кінетику гемолізу окремого еритроцита в гіпертонічному водному розчині проникаючої в клітину речовини. При цьому параметр α , очевидно, можна трактувати як об'ємний вміст гемоглобіну в еритроциті. Аналіз отриманих співвідношень показує, що з плином часу на етапі гемолізу у всіх випадках зменшується частота викидів внутрішньоклітинного вмісту з клітини і викликані цим зміни об'єму еритроцита. Крім того, частота утворення макроскопічної пори в мембрані еритроцита і, відповідно, частота викиду гемоглобіну з нього збільшуються, а амплітуда пульсацій об'єму і значення клітинного об'єму, за яких утворюються пори в мембрані, зменшуються зі зменшенням коефіцієнта проникності клітин для розчиненої в позаклітинному розчині речовини (K). на етапі виходу гемоглобіну з клітини її об'єм в середньому змінюється несуттєво, ненабагато перевищуючи y_s . Амплітуда і частота пульсацій об'єму збільшується також із зменшенням параметру C , пропорційного модулю розтягу мембрани еритроцита Γ і π' , тобто із зменшенням концентрації розчиненої в позаклітинному водному розчині речовини. На рис. 4.3-4.5 подана залежність часу, за який з еритроцита викидається половина гемоглобіну від того, що початково містився в клітині, від тих же параметрів. Як витікає з наведених даних, час, за який з еритроцита викидається певна

кількість гемоглобіну, із збільшенням параметрів K і C падає і росте майже прямо пропорційно осмотичному тиску розчиненої в позаклітинному середовищі речовини. Кількість внутрішньоклітинного розчину, що викидається з клітини назовні при утворенні кожної макроскопічної пори, збільшується з ростом коефіцієнта проникності.

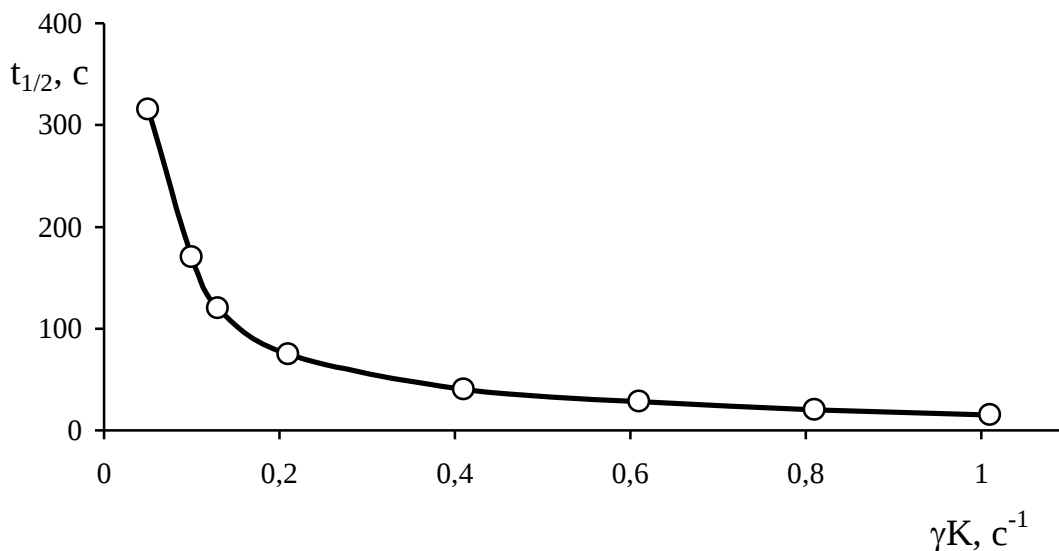


Рис. 4.3. Залежність часу, за який з еритроцита викидається половина вмісту гемоглобіну, від параметра γK

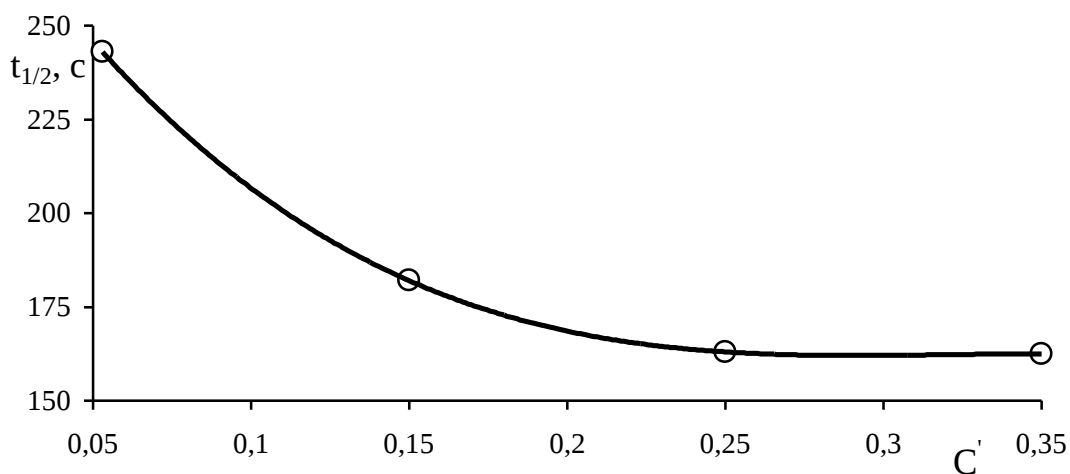


Рис. 4.4. Залежність часу, за який з еритроцита викидається половина вмісту гемоглобіну, від параметра C'

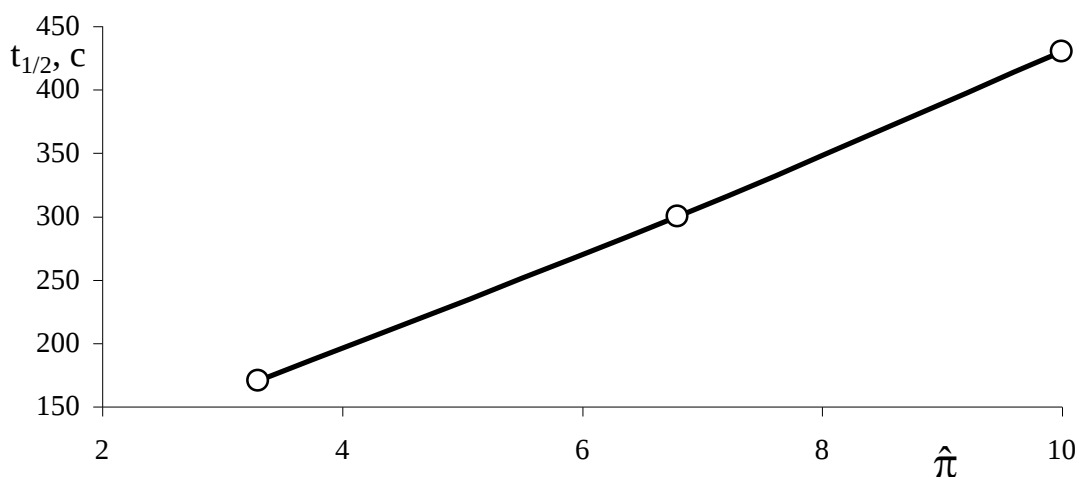


Рис. 4.5. Залежність часу, за який з еритроцита викидається половина вмісту гемоглобіну, від параметра $\hat{\pi}$

4.3. Висновки

Як витікає з наведених в цьому розділі роботи теоретичних результатів, розвинені в них уявлення про фізичний механізм гіпотонічного гемолізу пояснюють основні експериментально визначені закономірності цього явища. Кількісно описані всі етапи гіпотонічного гемолізу: етап набрякання еритроцита до досягнення сферичної форми та етап гемолізу, що відбувається внаслідок флуктуаційного багаторазового утворення та заліковування в ізотропно розтягнутій мембрані еритроцита макроскопічної пори. Побудована теорія не тільки пояснює наявність так званого сферичного періоду, існування якого обумовлено необхідністю розтягу мембрани до певного рівня і подолання енергетичного бар'єра між станами з нульовим і відмінним від нуля радіусом пори, але і дозволяє визначити його тривалість кількісно. Отримані результати і аналіз літературних даних свідчать на користь уявлень про те, що механізм гіпотонічного гемолізу клітин полягає у

флуктуаційному утворенні макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані. В сукупності з представленим в розділі 2 рішенням (2.7) для інтенсивності розсіяного суспензією сферичних часток світла в залежності від їх коефіцієнта заломлення отримані співвідношення є підставою для експериментального визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів до електрично нейтральних речовин з урахуванням часу гемолізу згідно з описаним механізмом. Побудована більш точна, ніж існуючі, фізико-математична теорія гемолізу еритроцитів у водному розчині проникаючої речовини.

РОЗДІЛ 5

ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ КОЕФІЦІЄНТІВ ПРОНИКНОСТІ МЕМБРАН ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ

Пасивна проникність клітинної мембрани визначається її загальною структурою: властивостями окремих компонентів, що входять до її складу, а також системою взаємодій між ними (ліпід-ліпідних, ліпід-білкових, білок-білкових, гідрофобних, електростатичних та ін.). Так, наприклад, як видно з огляду літератури, пасивна проникність ліпідного бішару тісно пов'язана з його текучістю, яка в свою чергу залежить від вмісту ненасичених жирних кислот, що мають подвійні зв'язки, а також від вмісту холестерину. Проникність тих чи інших речовин залежить також від властивостей їх молекул. Відомо, що коефіцієнти проникності для багатьох сполук визначаються ліпофільними властивостями молекул, які оцінюють на підставі порівняння так званих коефіцієнтів розподілу речовин в двофазній системі, котра складається з води та гідрофобної фази. Для багатьох речовин показано, що між величинами проникності та коефіцієнтів розподілу існує залежність, близька до прямої пропорційності. Вважають, що такі речовини проникають в клітини шляхом простої дифузії крізь ліпідний бішар плазматичної мембрани [57,77,79]. В той же час відомо, що малі нейтральні гідрофільні молекули, такі як мочеви́на, етиленгліколь і насамперед вода, легко проникають крізь мембрани окремих клітин. Еритроцити людини характеризуються аномально високою проникністю для молекул води [41-46,87,98]. Вони мають також високу проникність для малих гідрофільних неелектролітів [88,98]. Існує багато експериментальних даних, які свідчать про те, що вода та малі гідрофільні неелектроліти проникають крізь мембрани еритроцитів людини, принаймні частково, по каналам, утвореним іонообмінним інтегральним білком смуги 3 [24-27,87,88,90]. Проникність цих каналів блокується сульфгідрильними реагентами на кшталт pCMBS [92].

5.1. Визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів до речовин низки діолів

В нашій роботі ми вивчали проникність мембран еритроцитів людини до неелектролітів низки діолів. Напрямок наших досліджень був обумовлений, по перше, можливістю порівняння фізико-хімічних властивостей молекул в гомологічних рядах та серед структурних ізомерів і з'ясування впливу цих властивостей на їх проникність крізь біологічні мембрани. З практичної точки зору такий вибір був визначений широким застосуванням окремих діолів в кріобіологічній практиці.

Для дослідження було обрано низку полярних неелектролітів: етандіол (етиленгліколь), два структурні ізомери пропандіолу (1,2-пропандіол та 1,3-пропандіол), чотири структурних ізомери бутандіолу (1,2-, 1,3-, 2,3- та 1,4-бутандіол) і ді- та триетиленгліколь. Такий вибір речовин надав можливість оцінити вплив додавання тих чи інших груп в структурі молекул а також розмірів молекул на їх здатність до проникання. Важливим є той факт, що структурні ізомери, наприклад структурні ізомери бутандіолу, маючи однакові молекулярні маси та приблизно однакові розміри, характеризуються різними коефіцієнтами розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазами [203]. В той же час дослідження низки речовин “етиленгліколь-діетиленгліколь-триетиленгліколь” дозволило, безпосередньо прослідкувати вплив розмірів молекул на коефіцієнти проникності для цих речовин. Для визначення шляхів проникання молекул крізь еритроцитарні мембрани було також досліджено вплив інкубації еритроцитів з блокатором білкових каналів рCMBS на коефіцієнти проникності для перелічених речовин. Всі вимірювання в цій серії експериментів були зроблені при 20°C.

В результаті проведених досліджень були отримані коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини в нативному стані та після інкубації клітин з сульфгідрильним реагентом (рCMBS) (табл.5.1.)

Таблиця 5.1

Вплив коефіцієнта розподілу та геометричних параметрів молекул діолів на їх проникність крізь мембрани еритроцитів.

Речовина	Структурна формула	Коефіцієнти проникності, $P \cdot 10^6$ м/сек		Коефіцієнт розподілу, K_p	Геометричні параметри молекул		
		Нативні еритроцити	Еритроцити, проінкубовані з рСМБС		D, Å	L, Å	V, Å ³
Етиленгліколь (етандіол)	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	$1,98 \pm 0,48$	$0,526 \pm 0,092$	0,04	2,6	5,2	27,6
Діетиленгліколь	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$	$0,421 \pm 0,045$	$0,271 \pm 0,037$	-	4,1	7,2	95,0
Триетиленгліколь	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-(\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2)_2-\text{OH} \\ \\ \text{OH} \end{array}$	$0,162 \pm 0,044$	$0,14 \pm 0,002$	-	4,4	10,4	158
1,2-пропандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	$1,6 \pm 0,24$	$0,664 \pm 0,18$	0,076	3,7	5,0	53,7
1,3-пропандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	$0,897 \pm 0,3$	$0,572 \pm 0,057$	0,064	4,1	5,7	75,2
1,4-бутандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \quad \text{OH} \end{array}$	$0,979 \pm 0,292$	$0,646 \pm 0,141$	0,137	4,0	7,4	92,9
1,3-бутандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{OH} \quad \quad \text{OH} \end{array}$	$1,89 \pm 0,18$	$1,01 \pm 0,27$	0,182	3,6	6,0	61,0
2,3-бутандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}-\text{CH}-\text{CH}_3 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	$2,64 \pm 0,22$	$1,69 \pm 0,22$	0,227	3,9	5,8	69,2
1,2-бутандіол	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-\text{CH}_2 \\ \quad \\ \text{OH} \quad \text{OH} \end{array}$	$2,89 \pm 0,11$	$2,67 \pm 0,3$	0,308	4,3	6,1	88,5

Примітка: Вірогідність різниці між коефіцієнтами проникності нативних еритроцитів та еритроцитів, проінкубованих з рСМБС, для всіх речовин, крім триетиленгліколю, $>0,999$; для триетиленгліколю різниця не вірогідна.

В табл. 5.1 також представлені дані роботи [203] щодо коефіцієнтів розподілу досліджених речовин в системі "n-октанол÷вода" та геометричних параметрів молекул, розрахованих на основі моделей Стърта [204] за комп'ютерною програмою "Hyper Chem Pro v.5.1".

Як видно з поданих даних, немає прямої залежності коефіцієнтів проникності від одного з параметрів (геометричного або фізико-хімічного) для всіх досліджених речовин одночасно. Так, залежність коефіцієнта проникності (P) від коефіцієнта розподілу між водою та гідрофобною фазою (K_p) має вигляд, представлений на рис.5.1. Але, якщо умовно поділити досліджені речовини на дві групи: групу гідрофільних речовин та групу відносно гідрофобних речовин, то звертає на себе увагу права гілка кривої, котра містить дані для структурних ізомерів бутандіолу. Цікаво, що аналогічні коефіцієнти проникності для бутандіолів (крім 1,2-бутандіолу) були отримані в роботі [26]. Автори цієї роботи розглядають отримані ними дані виключно у світлі моделі водної пори. При цьому характеристики, одержані для одного з ізомерів (2,3-бутандіолу), руйнують струнку картину приведених авторами міркувань. Вони називають їх аномальними, оскільки коефіцієнт тертя між мембраною та речовиною, розрахований ними з експериментальних даних, є меншим, ніж для 1,2-пропандіолу, а коефіцієнт проникності - більшим, всупереч очікуваному авторами в зв'язку з додаванням групи $-CH_3$. Але якщо вважати, що проникання бутандіолів здійснюється також і крізь ліпідну фазу (на підставі даних щодо коефіцієнтів розподілу в системі "n-октанол÷вода"), то протиріччя зникають. Маємо для ізомерів бутандіолу чітку залежність між коефіцієнтом проникності крізь мембрани еритроцитів та коефіцієнтом розподілу між гідрофобним та гідрофільним середовищем. Коефіцієнт кореляції для наших даних становить 0,927. Аналогічно високим він є і для коефіцієнтів проникності, отриманих в роботі [26] ($r=0,84$), які досить задовільно збігаються з нашими величинами. Якщо ж додати, що коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами проникності до ізомерів бутандіолу, отриманих нами для еритроцитів,

проінкубованих з рСМБС, і коефіцієнтами розподілу становить 0,996 (графік 2 на рис 5.1), то версія проникання бутандіолів крізь ліпідну фазу видається вкрай імовірною. Таким чином, ігнорування авторами [26] одного з шляхів проникності бутандіолів, а саме ліпідного, позбавляє їх можливості повністю пояснити отримані ними експериментальні дані.

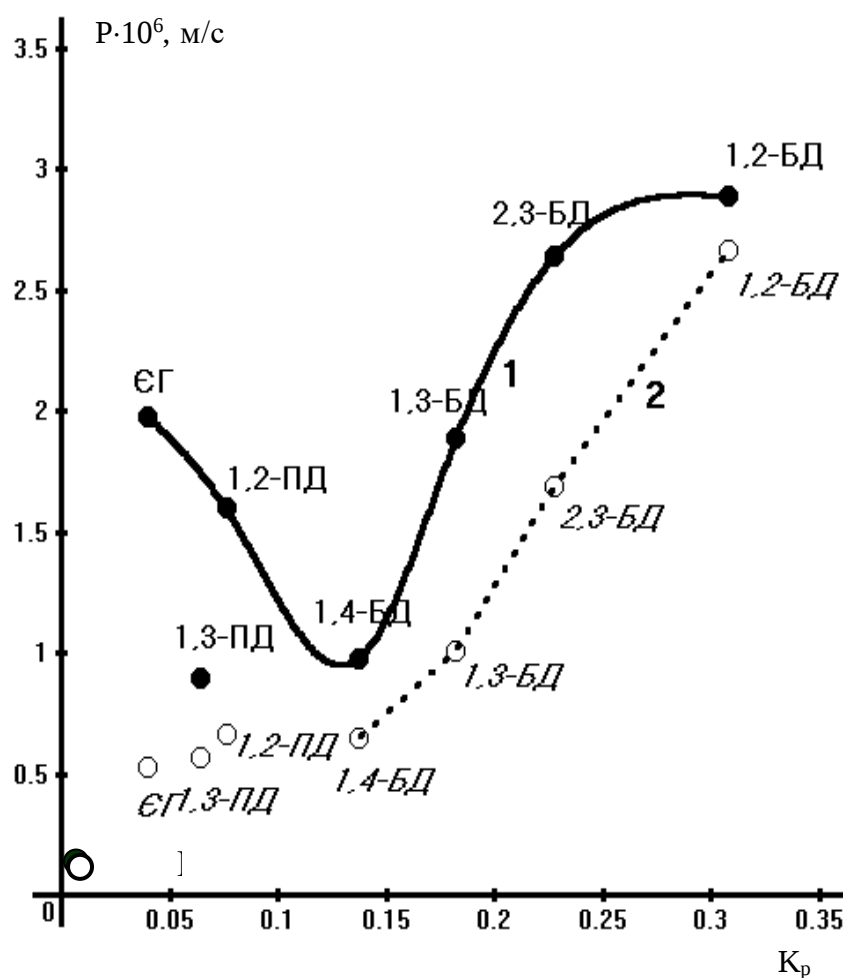


Рис. 5.1. Залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для молекул діолів та гліцерину від коефіцієнта розподілу цих речовин в системі “п-октанол÷вода”

● - нативні еритроцити, ○ - проінкубовані з рСМБС

Хоча автори роботи [26] мимохідь зазначають, що аномально висока проникність 2,3-бутандіола може бути пов’язана з його більшою розчинністю в ліпідній фазі, але в подальшому вони ніяк не обговорюють цю можливість.

До того ж, в низці досліджених речовин в їх роботі немає 1,2-бутандіолу, який, як ми бачимо з табл.5.1, характеризується ще більшим коефіцієнтом розподілу. ніж 2,3-бутандіол, і, відповідно, більшим коефіцієнтом проникності крізь мембрани еритроцитів.

З другого боку, той факт, що обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом приводить до достатньо значного пригнічення проникання бутандіолів, свідчить про те, що білкові водні шляхи є також доступними для них. Якщо звернутись до даних щодо розмірів молекул бутандіолів, то їх вплив на коефіцієнти проникності є не таким прозорим. Немає кореляції між коефіцієнтами проникності нативних клітин та діаметрами молекул бутандіолів ($r=0,36$). Коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами проникності клітин, оброблених рСМBS та діаметрами молекул є також не дуже великим ($r=0,68$). Очевидно, що для низки ізомерів бутандіолу більш впливовим чинником щодо коефіцієнтів проникності є коефіцієнт розподілу між водою та гідрофобною фазою. Але, якщо оцінити кореляцію між відсотком пригнічення проникності після обробки сульфгідрильним реагентом та діаметром молекул ($r= -0.957$), то отриманий коефіцієнт кореляції однозначно підтверджує припущення про існування білкового шляху проникання бутандіолів.

Аналіз даних для групи гідрофільних речовин (етиленгліколь, 1,2-пропандіол, 1,3-пропандіол) (ліва гілка кривої 1 на рис.5.1 та табл. 5.1), показує, що проникність етиленгліколю та пропандіолів визначається не коефіцієнтами розподілу, а розмірами. Коефіцієнт кореляції між проникністю цих речовин та діаметром і об'ємом молекул становить 0,9 та 0,97 відповідно. Очевидно, що в зв'язку з високою гідрофільністю цих неелектролітів проходження їх крізь водні канали є більш прийнятним, і тому зрозумілим стає така сильна залежність від розмірів молекули. Цікавим є той факт, що, незважаючи на невелику різницю в коефіцієнтах розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазою ізомерів пропандіолу, коефіцієнт проникності для 1,2-пропандіолу більше ніж в два рази перевищує коефіцієнт проникності для

1,3-пропандіолу (рис.5.1, 5.2), а після інкубації з рСМBS вони відрізняються лише в 1,3 рази (рис.5.1, 5.3).

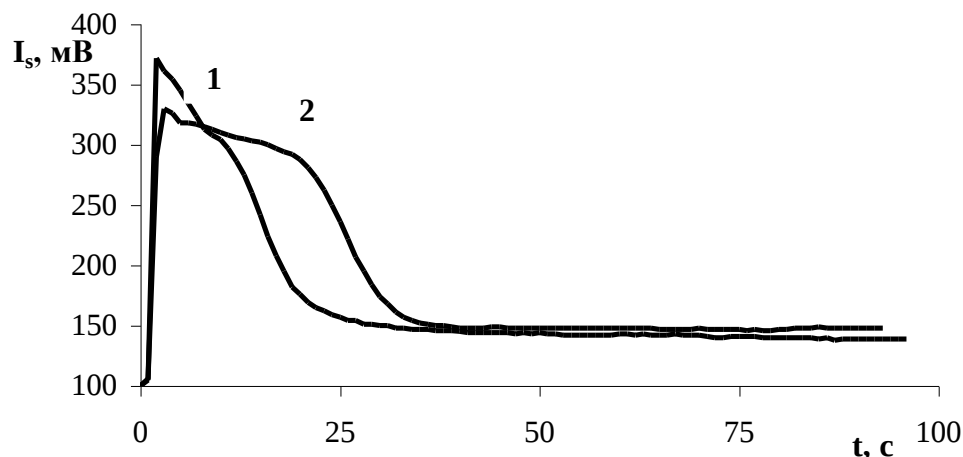


Рис. 5.2. Кінетичні криві гемолізу нативних еритроцитів у водних розчинах 1,2-пропандіолу (1) та 1,3-пропандіолу (2)

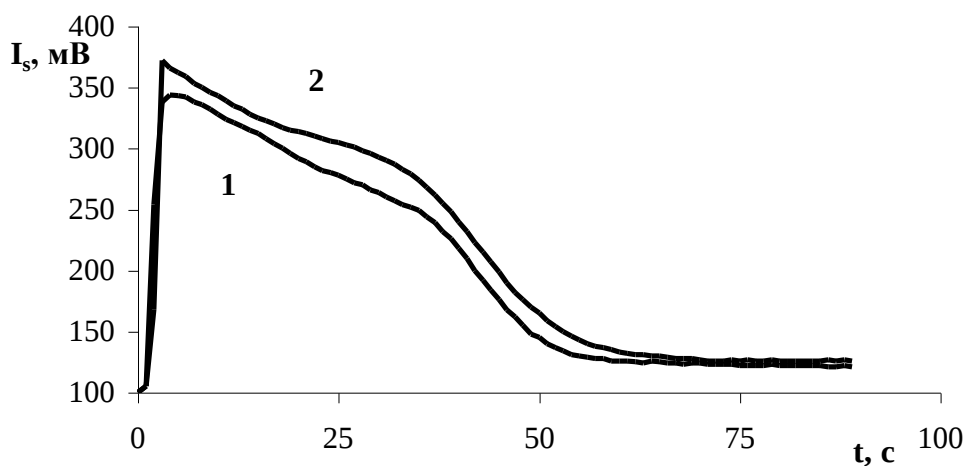


Рис. 5.3. Кінетичні криві гемолізу еритроцитів, проінкубованих з рСМBS, у водних розчинах 1,2-пропандіолу (1) та 1,3-пропандіолу (2)

Інкубація еритроцитів із сульфгідрильним реагентом пригнічує проникність 1,2-пропандіолу на 58% (рис.5.1, 5.4), а 1,3-пропандіолу лише на 36,3% (рис.5.1, 5.5). Це означає, що різниця в розмірах молекул цих ізомерів приводить до значного зменшення проникності 1,3-пропандіолу по водних каналах, а висока гідрофільність перешкоджає проходженню крізь ліпідну фазу.

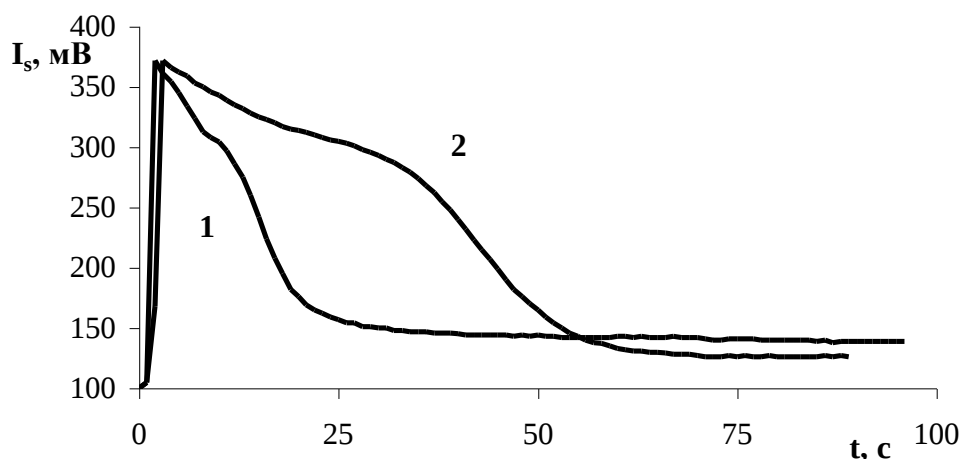


Рис. 5.4. Кінетичні криві гемолізу нативних (1) та проінкубованих з pCMBS (2) еритроцитів у водному розчині 1,2-пропандіолу

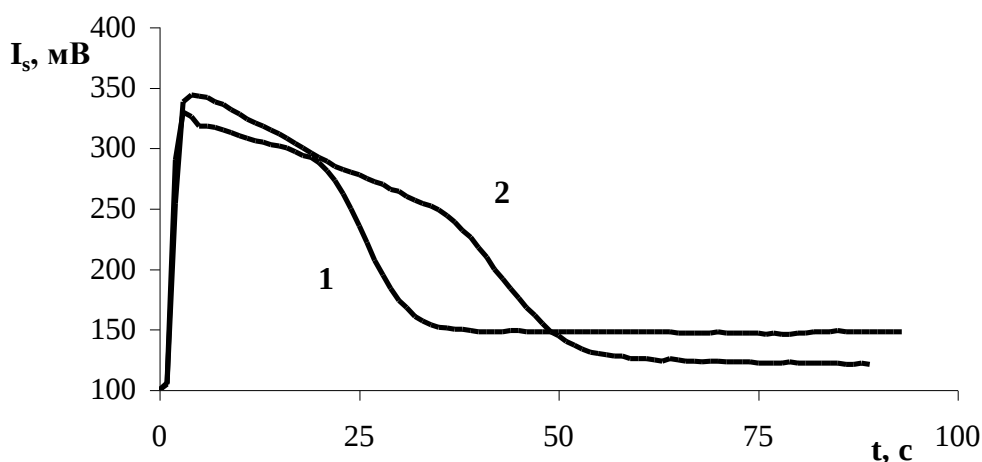


Рис. 5.5. Кінетичні криві гемолізу нативних (1) та проінкубованих з pCMBS (2) еритроцитів у водному розчині 1,3-пропандіолу

Таким чином, перехід від діаметра $3,7\text{ \AA}$ для 1,2-пропандіолу до діаметра $4,1\text{ \AA}$ для 1,3-пропандіолу є критичним для проходження крізь канал. Крім того, трохи більша гідрофільність 1,3-пропандіолу означає, що енергія зв'язку гідрофільних ОН-груп з водою є більшою, ніж у випадку 1,2-пропандіолу, у якого внутрішньо-молекулярні водневі зв'язки сусідніх ОН-груп зменшують енергію міжмолекулярних водневих зв'язків, а, отже, і ефективну товщину гідратної оболонки. Ці дані підтверджують відому думку, що є два головних вирішальних чинника, які визначають

проходження малих гідрофільних молекул крізь еритроцитарну мембрану: розмір молекули та її здатність утворювати водневі зв'язки. Також слід відзначити важливість присутності в дослідженій нами низці речовин двох ізомерів пропандіолу, на відміну від роботи [26], що надало нам можливість виявити різницю в прониканні двох майже однакових молекул внаслідок деякої різниці в розмірах та гідрофільності.

Висновок про важливість розмірів молекул для проникання крізь мембрани еритроцитів підтверджується також даними для ізомерів бутандіолу. Відсоток пригнічення проникності після обробки сульфгідрильним реагентом різко зменшується для 1,2-бутандіолу (діаметр молекули $4,3 \text{ \AA}$) і становить лише 7,6% в порівнянні з іншими ізомерами бутандіолу, для яких він становить 34-47% (діаметри молекул є $3,6 \text{ \AA}$, $3,9 \text{ \AA}$ та $4,0 \text{ \AA}$ для 1,3-, 2,3- та 1,4-бутандіолу відповідно). Це проявляється також в значному зменшенні нахилу кривої 1 (рис. 5.1) при переході від 2,3-бутандіолу до 1,2-бутандіолу. Якщо взяти до уваги оцінку розмірів каналу, утвореного білком смуги 3, яку дає Solomon [26] (радіус еквівалентної пори $6,5 \text{ \AA}$), і те, що молекула може проникати крізь канал разом з гідратною оболонкою, що збільшує розмір молекули приблизно удвічі [205], можна вважати, що наша оцінка розміру пори цілком задовільно збігається з даними роботи [26].

Порівняння коефіцієнтів проникності в низці: етиленгліколь-діетиленгліколь-триетиленгліколь приводить до тих же висновків (табл.5.1, рис.5.6). Так, коефіцієнт проникності різко зменшується від етиленгліколю ($D=2,6 \text{ \AA}$) до діетиленгліколю ($D=4,1 \text{ \AA}$). Обробка еритроцитів pCMBS різко зменшує проникність для етиленгліколю (на 77%) (табл.5.1, рис.5.7), яка в нормі є порівняно високою, тобто можна сказати, що етиленгліколь проникає крізь мембрану еритроцита в основному крізь водні канали. Для діетиленгліколю, діаметр молекули якого співпадає з діаметром 1,3-пропандіолу ($4,1 \text{ \AA}$) пригнічення проникності становить лише 35,6 % (табл.5.1, рис.5.8) і є таким же, як для 1,3-пропандіолу (36,3%). Коефіцієнти

проникності діетиленгліколю як для нативних, так і для проінкубованих з сульфгідрильним реагентом еритроцитів, є меншими за коефіцієнти проникності 1,3-пропандіолу в 2,1 рази. Це, очевидно, пояснюється тим, що при збігу діаметрів цих молекул довжина і об'єм діетиленгліколю суттєво перевищують ці параметри для 1,3-пропандіолу. Що ж до триетиленгліколю, то він має коефіцієнт проникності більш ніж на порядок нижчий, ніж етиленгліколь, а обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом майже не впливає на його величину. Тобто можна з впевненістю сказати, що молекули триетиленгліколю не проникають крізь водні канали.

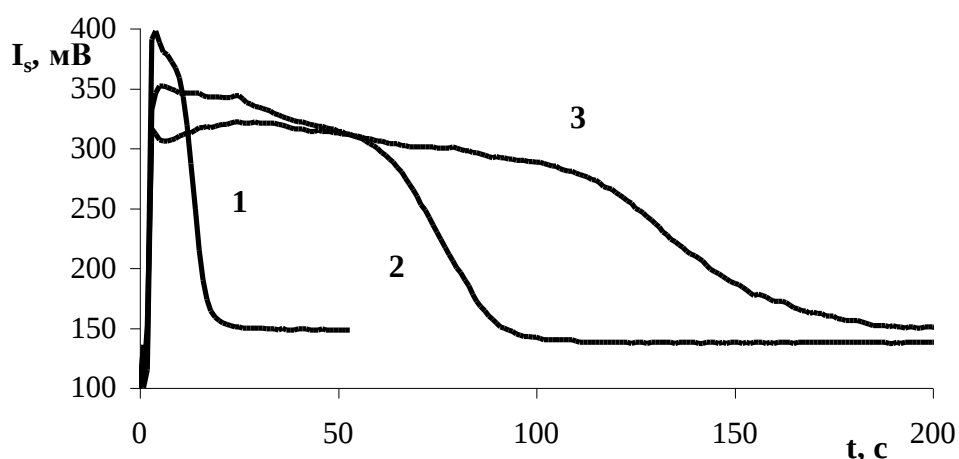


Рис. 5.6. Кінетичні криві гемолізу нативних еритроцитів у водних розчинах етиленгліколю (1), діетиленгліколю (2) та триетиленгліколю (3)

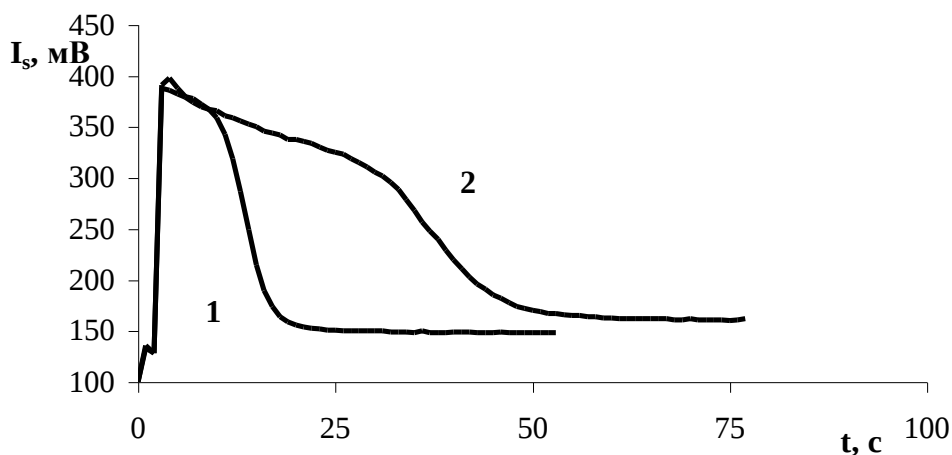


Рис. 5.7. Кінетичні криві гемолізу нативних (1) та проінкубованих з pCMBS (2) еритроцитів у водному розчині етиленгліколю

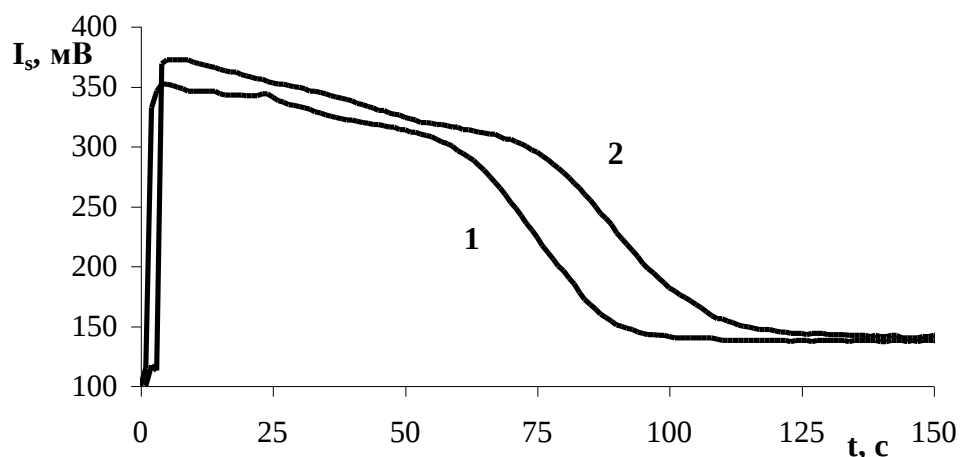


Рис. 5.8. Кінетичні криві гемолізу нативних (1) та проінкубованих з pCMBS (2) еритроцитів у водному розчині діетиленгліколю

Коефіцієнти кореляції між коефіцієнтами проникності нативних еритроцитів та розмірами молекул у низці гідрофільних речовин (етиленгліколь, діетиленгліколь, триетиленгліколь, 1,2-пропандіол, 1,3-пропандіол) становлять -0,89 та -0,926 для діаметра та об'єму молекул відповідно. Для еритроцитів, оброблених pCMBS, вони становлять -0,5 для діаметра і -0,927 для об'єму. Тобто, якщо для проходження молекул крізь канали значущими параметрами є як діаметр молекули, так і її об'єм, то для ліпідного шляху проникання в межах досліджених величин значущим геометричним параметром є тільки об'єм молекули. Високе значення коефіцієнту кореляції (0,94) між коефіцієнтом проникності pCMBS оброблених еритроцитів для всіх представлених діолів та їх коефіцієнтами розподілу в системі “n-октанол÷вода” надає неспростовні докази того, що проникання цих речовин крізь мембрани еритроцитів після їх інкубації з сульфгідрильним реагентом відбувається ліпідним шляхом.

Таким чином, у результаті проведених досліджень показано, що розроблений метод визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів до неелектролітів є адекватним, дає прийнятні логічні значення коефіцієнтів проникності, які задовільно узгоджуються з даними літератури.

Так, значення проникності для 1,4-бутандіолу еритроцитів, оброблених сульфгідрильним реагентом, тобто проникності крізь ліпідний бішар, отримане в наших експериментах ($0,646 \cdot 10^{-6}$ м/с), достатньо задовільно, враховуючи сильну залежність проникності ліпідних бішарів від їх складу, збігається з даними роботи [57] щодо проникності цього діола крізь BLM, отриманих з суміші фосфатидилхолін+холестерин, ($0,2 \cdot 10^{-6}$ м/с). Для суміші ж сфінгомієлін+холестерин коефіцієнт проникності BLM до 1,4-бутандіолу становить $0,03 \cdot 10^{-6}$ см/с. Ці значення дуже добре узгоджуються з даними про вплив вмісту ненасичених жирних кислот на проникність ліпідних бішарів: індекс подвійних зв'язків сфінгомієліну, фосфатидилхоліну та загальних ліпідів мембран еритроцитів людини становить 0,33, 0,96 та 1,4 відповідно [206]. Практично співпадає отримане нами значення коефіцієнта проникності нативних еритроцитів для етиленгліколю ($1,98 \cdot 10^{-6}$ м/с) з даними роботи [26] ($2,07 \cdot 10^{-6}$ м/с). Для інших досліджених нами діолів значення коефіцієнтів проникності трохи відрізняються від значень, отриманих в роботі [26], але зберігаються їх співвідношення. За даними цієї роботи вони становлять 0,72, 0,55, 1,1 та $1,7 \cdot 10^{-6}$ см/с для 1.2-пропандіолу, 1,4-, 1,3- та 2,3-бутандіолу відповідно.

Дослідження показали, що проникання малих прямоланцюгових спиртів здійснюється двома шляхами: білковими гідрофільними каналами сталого розміру, які блокуються сульфгідрильним реагентом, та ліпідним шляхом. Про проникання ліпідним шляхом свідчить прямо пропорційна залежність проникності діолів крізь мембрани еритроцитів, проінкубованих з pCMBS від коефіцієнтів розподілу між гідрофобною і гідрофільною фазами. Для проникання цим шляхом також характерна обернена залежність від об'єму проникаючих молекул. Проникність крізь білкові гідрофільні канали характеризується більш критичною залежністю від діаметра молекул. При перевищенні цим параметром величини $4 \text{ \AA}$ коефіцієнт проникності явно зменшується для більш гідрофільних молекул (пропандіоли). Геометричні розміри цих молекул є більш вирішальним чинником, що впливає на їх

проникність, тому вплив коефіцієнта розподілу в цьому випадку важко прослідкувати. Але збільшення гідрофільності може навіть зменшувати проникність крізь канал через збільшення енергії зв'язку з молекулами води, і, отже, збільшення ефективного розміру молекул. Для більш гідрофобних речовин (бутандіоли) зменшення проникності по білкових каналах проявляється в зменшенні відсотку блокування проникності, хоча загальна проникність зростає за рахунок збільшення проникності крізь ліпідний бішар.

5.2. Визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів до речовин низки амідів

В попередньому підрозділі представлено дані щодо проникності еритроцитів людини до діолів. Показано, що проникання досліджених речовин крізь мембрани еритроцитів відбувається двома альтернативними шляхами. Коротколанцюгові гідрофільні молекули діаметром до 4 Å вільно проникають по водних каналах, утворених білковими структурами. При перевищенні діаметром цієї величини молекули зазнають стеричних обмежень при проходженні крізь гідрофільні канали. При зростанні ліпофільних властивостей молекул збільшується ймовірність їх проникання шляхом безпосереднього розчинення в ліпідній фазі. В продовження цієї роботи нами була досліджена проникність мембран еритроцитів людини до низки амідів, які також відрізняються між собою розмірами молекул та коефіцієнтами розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазами внаслідок зміни кількості та розташування метильних груп. Для дослідження було обрано такі речовини: ацетамід, метилацетамід, диметилформахід та диметилацетамід. Вимірювання коефіцієнтів проникності здійснювали при 20°C.

Як і у випадку діолів, для виявлення шляхів проникання молекул амідів визначали коефіцієнти проникності мембран нативних еритроцитів та

еритроцитів, оброблених ртутним сульфгідрильним реагентом. Коефіцієнти проникності для досліджених речовин, їх структурні формули та розраховані геометричні параметри, а також коефіцієнти розподілу цих речовин в системі “п-октанол÷вода” [203] подані в табл.5.2.

Таблиця 5.2.

Вплив коефіцієнта розподілу та геометричних параметрів молекул амідів на їх проникність крізь мембрани еритроцитів.

Речовина	Структурна формула	Коефіцієнти проникності, $P \cdot 10^6$ м/сек		Коефіцієнт розподілу, K_p	Геометричні параметри молекул		
		Нативні еритроцити	Еритроцити, проінкубовані з рСМBS		D, Å	L, Å	V, Å ³
Ацетамід	<chem>CC(=O)N</chem>	2,66±0,18	0,528±0,07	0,062	3,2	3,8	30,5
Метилацетамід	<chem>CC(=O)NC</chem>	2,64±0,2	1,37±0,23	0,113	3,3	4,9	42,4
Диметилформамід	<chem>CN(C)C=O</chem>	2,96±0,1	1,96 ±0,13	0,233	3,9	4,1	44,0
Диметилацетамід	<chem>CC(=O)N(C)C</chem>	2,86±0,14	2,04±0,22	0,291	4,2	5,1	70,6

Примітка: Вірогідність різниці між коефіцієнтами проникності нативних еритроцитів та еритроцитів, проінкубованих з рСМBS, для всіх речовин >0,999

Як видно з представлених даних, коефіцієнти проникності нативних еритроцитів для досліджених речовин низки амідів мало відрізняються між собою, хоча проникність для диметилформаміду вірогідно зростає порівняно з ацетамідом та метилацетамідом ($P=0,999$). Аналогічно слід було чекати подальшого зростання коефіцієнта проникності при переході до диметилацетаміду внаслідок збільшення коефіцієнта розподілу. Але коефіцієнт проникності для диметилацетаміду є навіть меншим, ніж для диметилформаміду ($P=0,95$) (рис.5.9, крива 1). Але якщо звернутись до шостої шпальти таблиці, в якій подані діаметри молекул, то, як і у випадку діолів, бачимо, що перевищення діаметром величини 4 Å приводить до зменшення коефіцієнту проникності, очевидно, за рахунок зменшення внеску проникності крізь водні пори в загальну проникність для цієї речовини. Це підтверджується даними четвертої шпальти таблиці 5.2.

Отримані нами коефіцієнти проникності еритроцитів, оброблених рСМБС, ще раз підтверджують висунуте нами припущення про альтернативний (ліпідний) шлях проникання досліджуваних речовин крізь мембрани еритроцитів. Очевидно, що коефіцієнти проникності еритроцитів, проінкубованих з сульфгідрильним реагентом, зростають слідом за збільшенням коефіцієнта розподілу в представленій низці амідів (рис.5.9, крива 2), коефіцієнт кореляції становить 0,94. Ці результати добре узгоджуються з результатами для ізомерів бутандіолу, де коефіцієнт кореляції для аналогічних параметрів становив 0,996. Більш високе значення коефіцієнта кореляції для бутандіолів може бути пов'язане з тим, що в цьому випадку низка речовин складалась із структурних ізомерів з однаковою

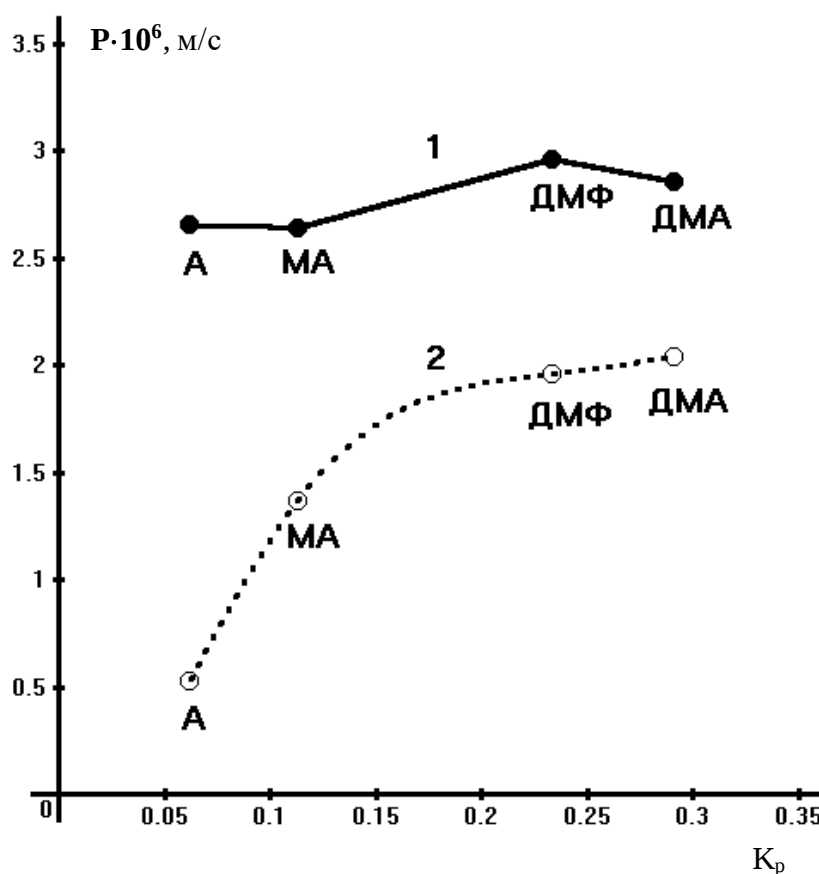


Рис. 5.9. Залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для молекул амідів від коефіцієнта розподілу цих речовин в системі "п-октанол-вода"

● - нативні еритроцити, ○ - проінкубовані з рСМБС

молекулярною масою, тоді як розглянуті нами аміди більше відрізняються між собою за молекулярною масою та об'ємом молекул. Відсоток пригнічення проникності амідів інкубацією з сульфгідрильним реагентом зменшується відповідно до збільшення розмірів молекул, зокрема діаметра. Для диметилацетаміду, діаметр якого становить $4,2 \text{ \AA}$ він становить лише 28,5%. Для порівняння слід згадати, що відсоток пригнічення проникності для 1,3-пропандіолу, діаметр якого становить $4,1 \text{ \AA}$ є 36,3%. Коефіцієнт кореляції між відсотком пригнічення проникності амідів та діаметром їх молекул становить $-0,87$. Слід зазначити, що коефіцієнт проникності проінкубованих з pCMBS еритроцитів для ацетаміду та етиленгліколю, які мають близькі геометричні параметри та коефіцієнти розподілу, практично співпадають ($0,528 \cdot 10^{-6}$ та $0,526 \cdot 10^{-6}$ відповідно).

В своїй роботі [27] Solomon припускає, що механізм проникання амідів крізь водний канал відрізняється від такого для діолів. Він вважає, що діоли проникають в канал разом з гідратною оболонкою, тоді як аміди, начебто внаслідок більшої енергії водневих зв'язків з водою, при входженні в канал повинні обміняти ці зв'язки на водневі зв'язки зі стінками пори. На наш погляд, по-перше, немає підстав вважати, що енергії водневих зв'язків амідів та діолів з водою суттєво відрізняються. Так, для амідів енергія водневих зв'язків з водою становить $17,5\text{-}18 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ [207]. Для діолів немає точних даних щодо цієї характеристики, але, враховуючи значення енергій водневих зв'язків для одноатомних спиртів, можна очікувати, що енергія водневих зв'язків діолів з водою становить $16\text{-}17 \text{ кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$ [208]. По-друге, якщо енергія водневих зв'язків для амідів і є дещо більшою, то це може бути лише додатковою підставою не розставатися із своєю гідратною оболонкою. Вирішальну роль, на наш погляд, тут відіграватимуть розміри водного каналу. До того ж, отримані нами результати свідчать про те, що проникання як діолів, так і амідів, дотримуються однакових закономірностей: (1) проникання крізь водну пору обмежується розмірами молекул, зокрема діаметром: перевищення діаметром значення $4 \text{ \AA}$ як для діолів, так і для

амідів, значно зменшує пригнічення проникності сульфгідрильним реагентом; (2) проникність еритроцитів, оброблених рСМBS, як в низці діолів, так і в низці амідів, корелює з коефіцієнтами розподілу цих речовин між гідрофільною і гідрофобною фазами.

Таким чином, розробленим нами методом [192] отримані величини коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для речовин низки амідів, які задовільно узгоджуються з даними інших авторів. Так, коефіцієнт проникності для ацетаміду $(2,68 \pm 0,18) \cdot 10^{-6}$ практично співпадає з даними роботи [27] $(2,76 \pm 0,5) \cdot 10^{-6}$. Добре узгоджується виміряна нами величина проникності для ацетаміду еритроцитів, оброблених сульфгідрильним реагентом, з величиною коефіцієнту проникності BLM із суміші фосфатидилхолін+холестерин для цієї речовини $(0,196 \cdot 10^{-6} \text{ м/с})$, отриманої в роботі [57]. Як і у випадку з 1,4-бутандіолом, ця величина є трохи меншою за нашу, що цілком відповідає значенням індексів подвійних зв'язків фосфатидилхоліну (0,96) та загальних ліпідів еритроцитів людини (1,4). В той же час, для метилацетаміду отримана нами величина коефіцієнта проникності є більшою (в 1,5 рази), ніж в роботі [27]. Ці розбіжності можуть бути пов'язаними з розбіжностями для різних донорів, на яких наголошує Solomon. Наш досвід також підтверджує, що індивідуальні властивості донорів дають найбільший внесок в квадратичне відхилення від середнього значення. По-друге, коефіцієнти проникності є концентраційно залежними [26,27], тому не зовсім ясно, чи для даної речовини подані в літературі дані відповідають максимальній величині проникності в діапазоні насичення. Крім того, як вже зазначалось, визначення коефіцієнтів проникності методом нульового часу [7] має низку недоліків, наприклад, пов'язаних з апроксимацією експериментальної кривої зміни об'єму квадратичною функцією. Значення коефіцієнтів проникності при такій апроксимації залежать від інтервалу апроксимації [10]. Загалом же, порівняльний аналіз наших результатів з даними літератури дає підстави вважати, що узгодження є задовільним.

Виходячи з отриманих результатів можна зробити висновок, що проникання досліджених нами речовин крізь мембрани еритроцитів відбувається двома альтернативними шляхами: водними каналами, утвореними білковими структурами, та безпосереднім розчиненням в ліпідній фазі. Про це свідчать дані кореляційного аналізу між коефіцієнтами проникності нативних та оброблених сульфгідрильним реагентом еритроцитів та коефіцієнтами розподілу досліджених проникаючих речовин між гідрофільною та гідрофобною фазами. Проникання речовин крізь гідрофільні канали обмежується стеричними чинниками, зокрема діаметром молекул.

На відміну від нашої інтерпретації, Solomon [24] вважає, що після конформаційних змін білка смуги 3, що утворює пору, викликаних взаємодією з pCMBS, залишкова проникність розчинених речовин та води може бути пов'язана з тими ж каналами, але зростають стеричні обмеження, пов'язані з їх конформаційними перетвореннями. Якби це було так, зокрема для амідів та діолів, тоді меншого пригнічення зазнавали б менші за розмірами молекули. Але за нашими даними найбільшого пригнічення зазнають потоки саме малих гідрофільних неелектролітів, таких як ацетамід, етиленгліколь, 1,2-пропандіол, які у випадку нативних еритроцитів мають достатньо великі коефіцієнти проникності. В той же час менших змін зазнають коефіцієнти проникності тих речовин, молекули яких гірше проникають крізь мембрани нативних еритроцитів саме внаслідок стеричних обмежень (диметилацетамід, 1,3-пропандіол, триетиленгліколь), а також тих речовин, коефіцієнти розподілу яких між гідрофільною та гідрофобною фазами мають порівняно великі значення, (диметилацетамід, диметилформамід, 2,3- та 1,2-бутандіол). До того ж, на користь нашої інтерпретації свідчать дані про проникність штучних ліпідних бішарів до ацетаміду та 1,4-бутандіолу, які є дуже близькими до величин проникності, отриманих нами для оброблених pCMBS еритроцитів.

5.3. Фізико-математична модель дифузії малих електронеітральних молекул крізь білкові мембранні пори

Під дією перепаду концентрацій дифузія малих електронеітральних молекул може здійснюватись двома паралельними шляхами: за рахунок розчинення і дифузії безпосередньо в ліпідній частині мембрани та крізь гідрофільні пори. Останні або виникають і зникають в мембрані внаслідок теплових флуктуацій [80,81], або постійно існують в ній. Зокрема, такими порами можуть бути білкові канали, які здійснюють селективний переніс іонів, а по відношенню до невеликих електронеітральних молекул є неселективними порами [24]. В попередніх підрозділах показано, що молекули діолів та амідів дійсно проникають в еритроцити людини як крізь ліпідну фазу мембран, так і каналами, утвореними білком смуги 3.

Дифузійний потік розчиненої в поза- та внутрішньоклітинному середовищі речовини крізь клітинну мембрану (J) в такому випадку визначається виразом:

$$J = J_n + J_l = (S_n K_n + S_l K_l) \Delta C \quad (5.1)$$

де S_n та S_l – площа, яку займають пори і ліпідні молекули в мембрані відповідно, ΔC – трансмембранний перепад концентрації дифундуючої речовини, J_n та J_l – дифузійні потоки речовин крізь білкові мембранні пори і ліпідну частину мембрани відповідно, K_n та K_l - коефіцієнти проникності пор і суцільного ліпідного бішару для тієї ж речовини.

В попередніх підрозділах представлено результати вимірювання ефективних коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини $P = (S_n/S)K_n + (S_l/S)K_l$ (S -площа поверхні мембрани) для низки речовин при температурі 20°C. Для тих же речовин виміряні коефіцієнти проникності мембран еритроцитів, проінкубованих з ртутним сульфгідрильним реагентом рСМБС, який на думку багатьох дослідників блокує білкові канали, утворені

найімовірніше білком смуги 3 [24,87,92,209,210]. Виходячи з отриманих результатів, ми зробили висновок, що після обробки еритроцитів реагентом pCMBS залишкова проникність визначається проникністю крізь ліпідний бішар $P_L = (S_L/S)K_L$.

Оскільки сумарна площа S_n , яку займають водні пори, за даними літератури [24] є набагато меншою порівняно з площею S_L , яку займають ліпіди, можна з великою точністю вважати $P_L = (S_L/S)K_L \cong K_L$. Далі, з отриманих експериментальних даних, поданих на 2 і 3 шпальтах таблиці 5.3, визначаємо величини $P_n = (S_n/S)K_n$, які характеризують трансмембранну дифузію безпосередньо крізь водні пори (табл.5.3, 4 шпальта).

Молекули речовин, проникність яких досліджувалась, у вакуумі наближено можна розглядати як такі, що мають форму зрізаного кругового прямого циліндра з діаметром основи d і довжиною l . Нами показано, що є сильна кореляція між величинами P_n і розмірами проникаючих крізь мембрану еритроцитів молекул. Розглянемо проникання малих прямоланцюгових молекул крізь циліндричну пору на підставі простих фізичних та геометричних міркувань.

Як відомо [211], молекули, кількість вуглецевих груп в яких не перевищує 14, практично не змінюють свою форму у водному оточенні. Але, розчинені у воді речовини оточені гідратною оболонкою, котра збільшує їх ефективні розміри. Найміцніше “пов’язаний” з розчиненою молекулою перший гідратний мономолекулярний шар води [208]. Ефективна товщина цього міцно зв’язаного з молекулою гідратного шару, звичайно, може відрізнитись для різних гідратованих молекул. Але, можна припустити, що вона варіює в порівняно невеликих межах і за порядком величини є зіставляваною з розмірами молекули води в кристалічній фазі (2,7 Å). Із урахуванням гідратації ефективний діаметр d_e і ефективна довжина l_e молекули стає рівною $d_e = d + 2h$ і $l_e = l + 2h$. Розглядаючи гідратну оболонку молекул як динамічну структуру, в якій агрегати молекул води існують тільки біля 10^{-11} с [212], можна припустити, що її ефективна товщина для

Таблиця 5.3. Експериментальні та розраховані значення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для низки речовин та геометричні параметри молекул цих речовин.

Речовина	$P \cdot 10^6$ $\text{м} \cdot \text{с}^{-1}$	$P_{\text{л}} \cdot 10^6$ $\text{м} \cdot \text{с}^{-1}$	$P_{\text{п}} \cdot 10^6$ $\text{м} \cdot \text{с}^{-1}$	$d, \text{\AA}$	$l, \text{\AA}$	$\sqrt{\frac{M_A}{M}}$	$h, \text{\AA}$	$d_e, \text{\AA}$	$l_e, \text{\AA}$	W_n	$P_{\text{п}} \cdot 10^6$ розр.
Етиленгліколь	1,980	0,526	1,454	2,6	5,2	0,977	2,3	7,2	9,8	0,6860	1,429
Діетиленгліколь	0,421	0,271	0,150	4,1	7,2	0,746	2,3	8,7	11,8	0,100	0,159
Триетиленгліколь	0,162	0,140	0,022	4,4	10,4	0,623	2,3	9,0	15,0	0,0358	0,0475
1,2-пропандіол	1,600	0,664	0,936	3,7	5,0	0,882	2,3	8,3	9,6	0,355	0,667
1,3-пропандіол	0,897	0,572	0,325	4,1	5,7	0,882	2,3	8,7	10,3	0,182	0,341
1,4-бутандіол	0,979	0,646	0,333	4,0	7,4	0,810	2,0	8,0	11,4	0,177	0,306
1,3-бутандіол	1,890	1,010	0,880	3,6	6,0	0,810	2,0	7,6	10,0	0,443	0,765
2,3-бутандіол	2,640	1,690	0,950	3,9	5,8	0,810	2,0	7,9	9,8	0,415	0,716
1,2-бутандіол	2,890	2,670	0,220	4,3	6,1	0,810	2,0	8,3	10,1	0,265	0,458
Ацетамід	2,660	0,528	2,132	3,2	3,8	1,000	2,3	7,8	8,4	1,000	2,132
Метилацетамід	2,640	1,370	1,270	3,3	4,9	0,900	2,3	7,9	9,5	0,600	1,125
Диметилформамід	2,960	1,960	1,000	3,9	4,1	0,900	2,3	8,5	8,7	0,624	1,190
Диметилацетамід	2,860	2,045	0,815	4,2	5,1	0,823	2,0	8,8	9,7	0,570	1,000

кожної гідратованої молекули може відрізнятись і залежати від її гідрофобності (гідрофільності), а також бути меншою, ніж розмір молекули води.

Позначимо діаметр водної пори (рис.5.10), крізь яку дифундують розчинені в позаклітинних областях речовини, як a . Ясно, що якщо максимальний розмір молекули $(l_e^2 + d_e^2)^{1/2}$ не перевищує діаметра пори, молекула може проходити крізь пору, маючи довільну орієнтацію в просторі. Навпаки, якщо і довжина і діаметр молекули перевищують розмір пори, то молекула не може пройти крізь мембранну пору через геометричні обмеження. В проміжному випадку, коли виконуються умови $d < a < (l_e^2 + d_e^2)^{1/2}$ або $l < a < (l_e^2 + d_e^2)^{1/2}$, молекула може потрапити в пору лише тоді, коли вона має певну орієнтацію в просторі відносно пори, точніше тоді, коли її вісь відхиляється від осі пори на кут, що не перевищує деяке визначене значення Θ_m .

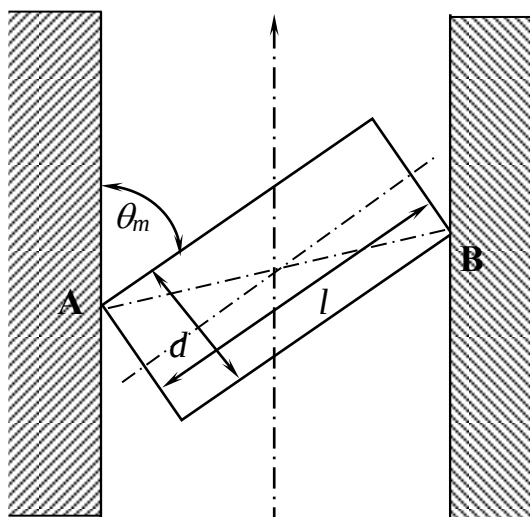


Рис.5.10 Схематичне зображення граничного положення циліндричної молекули в мембранній порі.

У випадку, що розглядається, наприклад, молекула не має змоги потрапити в пору якщо відрізок прямої АВ, що відповідає максимальному лінійному розмірові молекули, розташований поперек осі пори. Косинус кута Θ_m легко визначити з простих геометричних міркувань. Він становить

$$\cos\theta_m = \frac{ad_e \pm l\sqrt{l_e^2 + d_e^2 - a^2}}{l_e^2 + d_e^2} \quad (5.2)$$

Слід звернути увагу на приблизний характер розрахунку цієї величини. Проведений розрахунок відповідає орієнтації циліндричної молекули між двома паралельними площинами, відстань між якими становить a . Фактично ж, слід було розрахувати $\cos\theta_m$ для випадку орієнтації циліндричної молекули в циліндрі діаметром a . В цьому випадку стикання молекули зі стінкою пори може здійснюватись не в точках А і В, а в чотирьох точках, що не співпадають з ними. При цьому в розрахунок вноситься похибка, оскільки ефективний діаметр пори a^* за рахунок вказаного ефекту виявиться меншим, ніж дійсний діаметр a . Легко показати, що максимальна відносна похибка, що вноситься в розрахунок розбіжністю між a і a^* , визначається рівністю

$$\frac{a - a^*}{a} = \left(1 - \sqrt{1 - \frac{d^2}{4a^2}} \right)$$

Вона не перевищує 7,3% при $d \leq 9 \text{ \AA}$ і $a = 12 \text{ \AA}$. Тому з такою точністю $a \cong a^*$ і рівність (5.2) є справедливою.

Ясно, що за рахунок геометричних обмежень в пору можуть потрапити тільки молекули, вісь яких відхилена по відношенню до позитивного напрямку осі пори на кут, що знаходиться в межах

$$0 \leq \theta \leq \theta_m, \quad \pi - \theta_m \leq \theta \leq \pi \quad (5.3)$$

За рахунок хаотичного теплового руху молекул в ізотропній рідині орієнтація їх осей в просторі в будь-якому напрямку є однаково ймовірною. Легко довести, що ймовірність того, що вісь молекули орієнтована в інтервалах кутів, що визначені нерівностями (5.3), дорівнює

$$W = 1 - \frac{ad_e \pm l_e \sqrt{l_e^2 + d_e^2 - a^2}}{l_e^2 + d_e^2} \quad (5.4)$$

Ця ймовірність є пропорційною, але не рівною ймовірності W_n того, що молекули, які орієнтовані в інтервалах кутів, що визначаються нерівностями (5.3), здатні пройти крізь мембранну пору: $W_n = W/A$. Нормуючу константу A можна визначити з умови $W_n=1$ при $\sqrt{l_e^2 + d_e^2} = a$

$$A = \frac{l_e^2 + d_e^2}{l_e^2 + d_e^2 - ad_e}$$

Тому

$$W_n = 1 - \frac{l_e \sqrt{l_e^2 + d_e^2 - a^2}}{l_e^2 + d_e^2 - ad_e} \quad (5.5)$$

Як і слід було очікувати, в граничних випадках $W_n=1$ при $a = \sqrt{l^2 + d^2}$ і $W_n=0$ при $l=a$ і $d=a$.

Нехай у відсутності вказаних вище геометричних обмежень, тобто коли $a > (l^2 + d^2)^{1/2}$, коефіцієнт дифузії речовини в порі є D_A . В цьому випадку [211]

$$P_n^A = (S_n/S)(D_A/\delta),$$

де δ - товщина мембрани.

При наявності ж геометричних обмежень

$$P_n = (S_n/S)(D/\delta)W_n,$$

де D – коефіцієнт дифузії досліджуваної речовини в порі.

Комбінуючи дві останні рівності знаходимо

$$P_n = P_n^A (D/D_A) W_n \quad (5.6)$$

Оскільки, як відомо [213], в розчині $D \sim M^{-1/2}$, де M – молекулярна маса дифундуючої речовини,

$$P_n = P_n^A (M_A/M)^{1/2} W_n \quad (5.7)$$

За даними [26], розмір мембранних пор білкової природи в еритроцитах людини, по яких дифундують крізь мембрану невеликі електронейтральні молекули, коливається в межах 12-13 Å. Припустимо, що $a=12$ Å. При такому розмірі пор серед всіх досліджених речовин тільки максимальний розмір молекули ацетаміду не перевищує діаметра пори і тому можна ототожнити коефіцієнт дифузії цих молекул в мембранній порі з D_A , тобто прийняти

$$P_n^A = 2,132 \cdot 10^{-6} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1}$$

Отже

$$P_n = 2,132 \cdot 10^{-6} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1} (M_A/M)^{1/2} W_n \quad (5.8)$$

За допомогою останньої рівності з урахуванням (5.5) можна обчислити ефективний коефіцієнт P_n проникності тої чи іншої речовини крізь мембранні пори. Товщина гідратної оболонки в нашій моделі (5.8) є підгоночним параметром. Для ізомерів бутандіолу та диметилацетаміду, які є відносно більш гідрофобними, приймаємо $h=2$ Å, для решти речовин $h=2,3$ Å. Розраховані значення P_n подані в правій шпальті таблиці. Цілковитим задовільним узгодження експериментальних і розрахованих значень P_n свідчить на

користь адекватності побудованої нами моделі проникання невеликих електрично нейтральних молекул крізь гідрофільні мембранні пори. Отримані нами результати підтверджують уявлення про те, що в мембрані постійно існують канали, по яких здійснюється дифузія молекул електрично нейтральних речовин. Крім того, наші результати опосередковано свідчать про те, що ртутний сульфгідрильний реагент рСМBS дійсно блокує мембранні пори, не завдаючи суттєвого впливу на транспортні характеристики іншої (ліпідної) частини мембрани.

5.4. Проникність мембран еритроцитів людини для гліцерину та його ефірних похідних

Проведений в попередньому підрозділі теоретичний розгляд проникання малих електронейтральних молекул по водних мембранних порах на підставі простих фізичних та геометричних міркувань показав, що розраховані значення коефіцієнтів проникності цих речовин разом з мономолекулярною гідратною оболонкою крізь циліндричну пору діаметром $12 \text{ \AA}$ цілком задовільно узгоджуються з отриманими нами експериментальними даними для амідів та діолів. Ці результати свідчать про те, що модель водної пори, запропонована Solomon [24,26,27], адекватно описує механізм проникання малих електронейтральних молекул водними шляхами. В той же час, така узгодженість теоретичної моделі з експериментальними даними все ще не є неспростовним доказом того, що саме такі геометричні характеристики водної пори відповідають дійсності. Так, в роботах [10,98,102] висловлювались сумніви щодо таких великих розмірів білкових водних каналів. Масеу [98] вважає, що ці канали є набагато вузькими і можуть пропускати лише молекули води в один ряд, тобто одна за одною. Наші дані підтверджують думку Solomon [24,26,27,119] про спільні шляхи проникання для молекул води та малих неелектролітів, але все ще

однозначно не визначають розмірів цих каналів. Адже проникання молекул може здійснюватись так, як запропонував Solomon для амідів [27], з обміном водневих зв'язків з водою на водневі зв'язки зі стінками пори, тобто без гідратної оболонки.

Для подальшого вивчення цього питання ми провели дослідження проникності мембран еритроцитів людини для гліцерину та його моноалкілових ефірів: 1-ММЕГ, 1-МЕЕГ, 1-МПЕГ. Вибір речовин обумовлювався можливістю дослідити вплив енергії водневих зв'язків молекул з водою на їх проникання крізь водні білкові канали мембран еритроцитів. В результаті проведених досліджень були отримані коефіцієнти проникності для гліцерину та його ефірних похідних нативних еритроцитів та після їх інкубації з сульфгідрильним реагентом рСМBS. Результати експериментів, структурні формули та розраховані геометричні параметри молекул подані в таблиці 5.4.

Оскільки гліцерин виділяється своєю надзвичайно високою гідрофільністю (коефіцієнт розподілу в системі “n-октанол÷вода” майже в 50 разів менший (0,0027), ніж для етиленгліколю (0,012) [211]), природно було очікувати, що проникання гліцерину відбувається, принаймні частково, по гідрофільних білкових каналах. Але наші дослідження показали, що обробка сульфгідрильним реагентом не змінює коефіцієнт проникності мембран еритроцитів для гліцерину. Ці дані свідчать про те, що білкові канали є недоступними для молекул гліцерину. Цей висновок підтверджують також дані про розміри молекули гліцерину (діаметр становить 4,7 Å). До того ж, така висока гідрофільність означає більш сильний зв'язок з гідратною оболонкою, яка може бути суттєво більшою, ніж у етиленгліколю. З таблиці 5.4 також видно, що коефіцієнт проникності для гліцерину є на порядок меншим, ніж коефіцієнт проникності рСМBS оброблених еритроцитів для етиленгліколю (табл. 5.1.). Це корелює з даними про коефіцієнти розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазами.

Таблиця 5.4.

Вплив коефіцієнтів розподілу та геометричних параметрів молекул гліцерину та його ефірних похідних на їх проникність крізь мембрани еритроцитів.

Речовина	Структурна формула	Коефіцієнти проникності $P \cdot 10^6$, м/с		Коефіцієнт розподілу	Геометричні параметри молекул		
		Нативні еритроцити	Еритроцити проінкубовані з pCMBS		D, Å	L, Å	V, Å ³
Гліцерин	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—OH} \\ \\ \text{CH—OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{—OH} \end{array}$	0,038±0,003	0,038±0,008	0,0027	4,7	5,2	90,2
1-ММЕГ	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—O—CH}_3 \\ \\ \text{CH—OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{—OH} \end{array}$	1,52± 0,01	0,95±0,05	0,041	4,7	6,2	107,5
1-МЕЕГ	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—O—CH}_2\text{—CH}_3 \\ \\ \text{CH—OH} \\ \\ \text{CH}_2\text{—OH} \end{array}$	2,62±0,15	1,94±0,01	0,186	4,7	7,5	130,0
1-МПЕГ	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{—O—CH} \\ \quad \diagup \quad \diagdown \\ \text{CH—OH} \quad \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{—OH} \end{array}$	2,57±0,07	1,98±0,050	0,247	4,7	7,6	131,8

Є цікавим також той факт, що на відміну від еритроцитів людини, гліцерин майже не проникає в еритроцити бика [214,215], а швидкість проникання гліцерину в еритроцити щурів в 242 рази більша, ніж швидкість проникання в еритроцити вівці [216]. Як вже зазначалось, пасивна проникність ліпідних бішарів тісно пов'язана з їх текучістю, а відтак із вмістом ненасичених жирних кислот. В той же час, індекс подвійних зв'язків для ліпідів еритроцитів вівці, бика, людини та щура становить 0,7, 0,8, 1,4 та 1,7 відповідно. Це пов'язано з ліпідним складом мембран еритроцитів цих видів ссавців. Так, мембрани еритроцитів бика містять набагато більший відсоток (46,2%) сфінгомієліну (індекс подвійних зв'язків 0,33) порівняно з еритроцитами людини (25,8%) за рахунок фосфатидилхоліну (індекс подвійних зв'язків 0,96) [143]. Таким чином, версія проникання гліцерину саме крізь ліпідний бішар узгоджується з даними про ліпідний склад мембран еритроцитів різних видів ссавців. Наш висновок підтверджується також даними роботи [217], автори якої за результатами своїх досліджень

стверджують, що білок смуги 3 не є шляхом транспорту гліцерину в еритроцитах людини.

Отримані нами значення коефіцієнтів проникності для гліцерину не узгоджуються з даними роботи [26]. Але наведене в цій роботі значення $0,35 \cdot 10^{-6}$ м/с є, на наш погляд, зовсім нереальним. Так, за даними роботи [8], в якій проникність до гліцерину, визначали за методом 50%-го гемолізу без врахування часу флуктуаційного утворення пори, коефіцієнт проникності при 20°C становить для 1М гліцерину $0,015 \cdot 10^{-6}$ м/с. Як і очікувалось, ці дані є заниженими порівняно з нашими даними, отриманими модифікованим методом, що враховує механізм флуктуаційного утворення пори в процесі гіпотонічного гемолізу [192]. Але все ж вони є ближчими до реального часу проникання гліцерину в еритроцити людини, який спостерігається в експериментах, ніж дані роботи [26].

Як видно з таблиці 5.4 молекули всіх досліджених речовин за діаметром не перевищують розмір гліцерину, але мають більшу довжину. В той же час, результати показують, що обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом значно зменшує їх проникність для моноалкілових ефірів гліцерину. А це означає, що ці речовини частково проникають крізь білкові гідрофільні канали. На жаль, ми наразі не маємо експериментально визначених коефіцієнтів розподілу для перелічених речовин, крім гліцерину. Тому скористались теоретично розрахованими в роботах [182,211] значеннями (табл. 5.4). З наведених даних видно, що коефіцієнт розподілу 1-ММЕГ більш ніж на порядок вищий за коефіцієнт розподілу для гліцерину (значення для коефіцієнта розподілу гліцерину в даному випадку також взято з роботи [182] для коректності порівняння). Він майже збігається з розрахованим тим же способом [211] коефіцієнтом розподілу для 1,2-пропандіолу, який становить 0,039. Але коефіцієнт проникності молекул 1-ММЕГ крізь гідрофільні пори є значно меншим, ніж для 1,2-пропандіолу ($0,936 \cdot 10^{-6}$ м/с [218]), що узгоджується з їх суттєво більшими розмірами. В той же час більш гідрофільний 1,3-пропандіол ($K_p=0,023$ [211]), який є також

меншим за 1-ММЕГ, але більшим за 1,2-пропандіол [219], має меншу проникність крізь гідрофільні пори ($0,325 \cdot 10^{-6}$ м/с [218]).

Коефіцієнт проникності для 1-МЕЕГ є значно більшим, ніж для 1-ММЕГ, що корелює зі значеннями коефіцієнтів розподілу. З таблиць 5.4 і 5.5 та рис. 5.11 видно, що збільшення коефіцієнта проникності для 1-МЕЕГ забезпечується більшою мірою збільшенням проникності крізь ліпідну фазу, в той час як проникність крізь пору зростає не настільки суттєво. Коефіцієнт проникності для 1-МПЕГ є трохи меншим за коефіцієнт проникності для 1-МЕЕГ, але в цьому випадку вже за рахунок проникності крізь пору. Очевидно, що це пояснюється більшими розмірами молекул 1-МПЕГ. Коефіцієнт кореляції між проникністю для моноалкілових ефірів гліцерину проінкубованих з рСМБС еритроцитів (тобто проникністю крізь ліпідний бішар) та коефіцієнтами розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазами є достатньо високим і становить 0,97.

Таблиця 5.5.

Експериментальні та розраховані значення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для моноалкілових ефірів гліцерину.

Речовина	$P \cdot 10^6$, м/с	$P_l \cdot 10^6$, м/с	$P_p \cdot 10^6$, м/с	h , Å	$d_e =$ $d + 2h$, Å	$l_e =$ $l + h$, Å	$\sqrt{\frac{M_A}{M}}$	W_Π	$P_p \cdot 10^6$ розр.
1-ММЕГ	1,52	0,95	0,57	2,3	9,3	8,5	0,746	0,37	0,58
1-МЕЕГ	2,62	1,94	0,68	1,8	8,3	9,3	0,701	0,437	0,65
1-МПЕГ	2,57	1,98	0,59	1,8	8,3	9,4	0,663	0,406	0,59

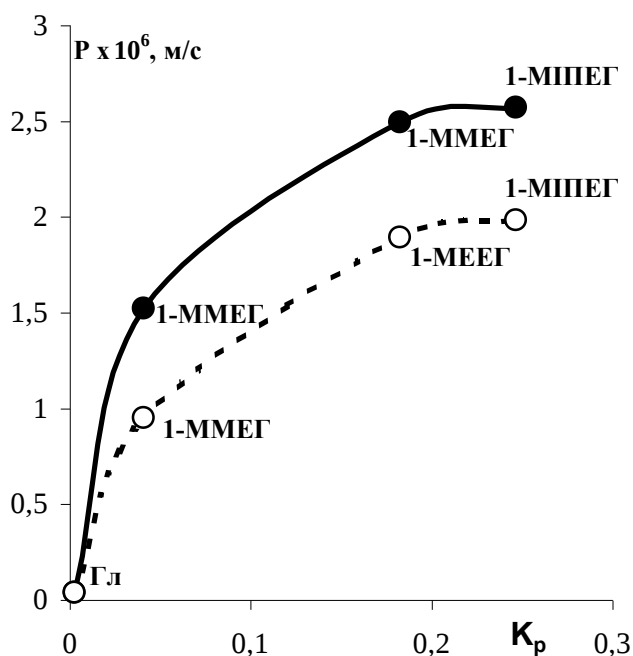


Рис. 5.11. Залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для молекул гліцерину та його моноалкілових ефірів від коефіцієнта розподілу цих речовин між гідрофобною та гідрофільною фазами

● - нативні еритроцити, ○ - проінкубовані з pCMBS

Проникання молекул ефірів гліцерину крізь гідрофільні канали на противагу молекулам гліцерину можна пояснити двома способами: (1) молекули цих речовин проникають крізь гідрофільні канали, втрачаючи свою гідратну оболонку, тоді як гліцерин має більшу енергію водневих зв'язків [220] і не розлучається з нею; (2) молекули проникають крізь канали разом з гідратною оболонкою, ефективна товщина якої у гліцерину є більшою, що і заважає його проникненню. За теорією пор Мулінза [212] бар'єром, що перешкоджає проникненню гідратованих молекул у вузьку пору, є енергія, котра необхідна для дегідратації молекули. Енергетичний бар'єр зникає, якщо молекули води, що втрачаються, заміщуються "еквівалентною кількістю зв'язків зі стінками пори". Молекули, розміри яких не відповідають розмірам пори (є більшими або меншими), виявляються недостатньо сольватованими стінками пори і не можуть увійти в неї. Тому,

сольватуюча пора буде проникною для молекули (або іона) при цілковитій відповідності розмірів молекули і пори. Отримані нами обернені залежності проникності діолів та амідів крізь водні канали від розмірів молекул, які є монотонними (без екстремумів) з коефіцієнтами кореляції $>0,9$, краще узгоджуються з версією проникання молекул разом з гідратною оболонкою, ефективна товщина якої залежить від гідрофобності молекули.

Теоретичний розрахунок коефіцієнтів проникності крізь циліндричну пору діаметром $12 \text{ \AA}$, аналогічний проведеному в попередньому підрозділі для амідів та діолів дає цілком задовільне узгодження з експериментальними величинами (табл.5.5), при припущенні, що ефективна товщина гідратної оболонки для 1-ММЕГ становить $2,3 \text{ \AA}$, як і для гідрофільних діолів, але з урахуванням в даному випадку асиметричного розташування гідрофобних та гідрофільних ділянок молекули, тобто вважаючи, що $d_e = d + 2h$, а $l_e = l + h$. Для 1-ММЕГ та 1-МПЕГ ефективну товщину гідратної оболонки вважали рівною $1,8 \text{ \AA}$, що є виправданим в зв'язку з їх значно більшою гідрофобністю.

Таким чином, у результаті проведених досліджень показано, що гліцерин не проникає крізь водні канали, утворені білком смуги 3. Порівняння проникності нативних та проінкубованих з сульфгідрильним реагентом еритроцитів для гліцерину та його моноалкілових ефірів свідчить про те, що причиною цього є не тільки розміри самої молекули гліцерину, але і її гідратної оболонки. Проникності моноалкілових ефірів гліцерину, які мають такий самий діаметр, але більшу довжину, частково блокуються інкубацією з pCMBS, що свідчить про їх проникання білковими каналами. Ці дані, в сукупності з результатами, отриманими нами для діолів та амідів, дають підстави вважати, що проникання цих молекул крізь білкові канали здійснюється разом з молекулами води, що утворюють їх гідратну оболонку. Розраховані при цьому припущенні значення коефіцієнтів проникності крізь білкові канали для низки досліджених речовин цілком задовільно узгоджуються з експериментальними даними.

5.5. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів людини до 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду

Той факт, що одним з найважливіших параметрів, який визначає проникання молекул крізь мембранні структури, є їх гідрофобність, або гідрофільність, ще раз підкреслює ведучу роль водного середовища у перебігу біологічних процесів і в самому існуванні та функціонуванні складних біологічних структур, таких як високомолекулярні активні білки та надмолекулярні біологічні структури, в першу чергу мембрани. Температура є невід'ємним чинником зовнішнього середовища, що впливає на структуру та взаємодію біологічних молекул та води. Вивчення температурних залежностей проникності мембран до різних речовин є інформативним методом дослідження структури мембран та механізмів цієї проникності. В цьому підрозділі представлені результати дослідження впливу температури на коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для двох широко вживаних кріопротекторів: диметилсульфоксиду (ДМСО) та 1,2-пропандіолу (1,2-ПД). Кінетичні криві гемолізу в 1 М водних розчинах 1,2-ПД та ДМСО при температурах 37 – 3°C представлені на рис.5.12-5.13.

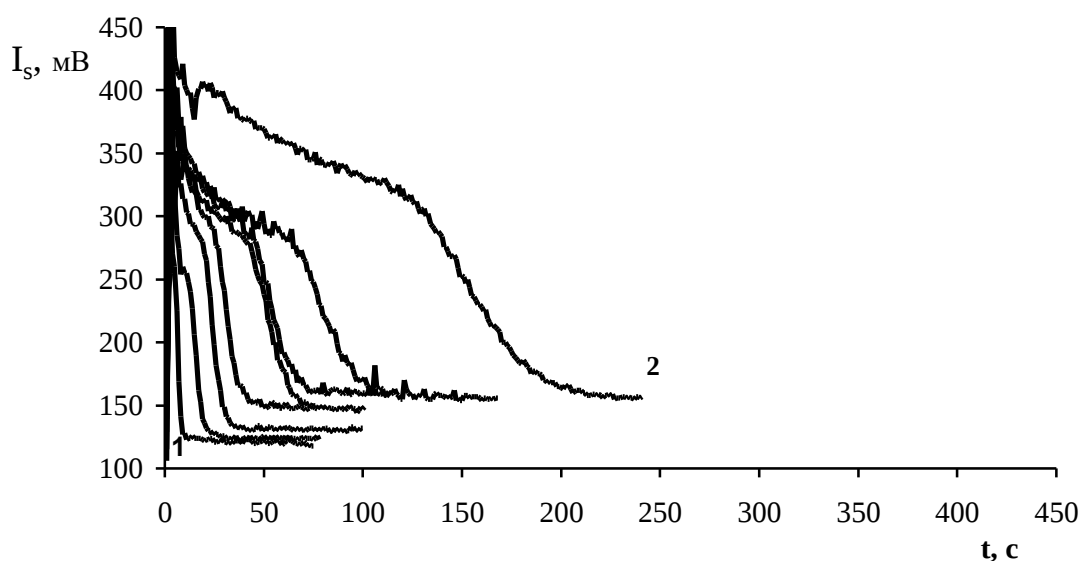


Рис. 5.12. Кінетичні криві гемолізу в 1М водному розчині 1,2-ПД при температурах 37°C (1) – 3°C (2)

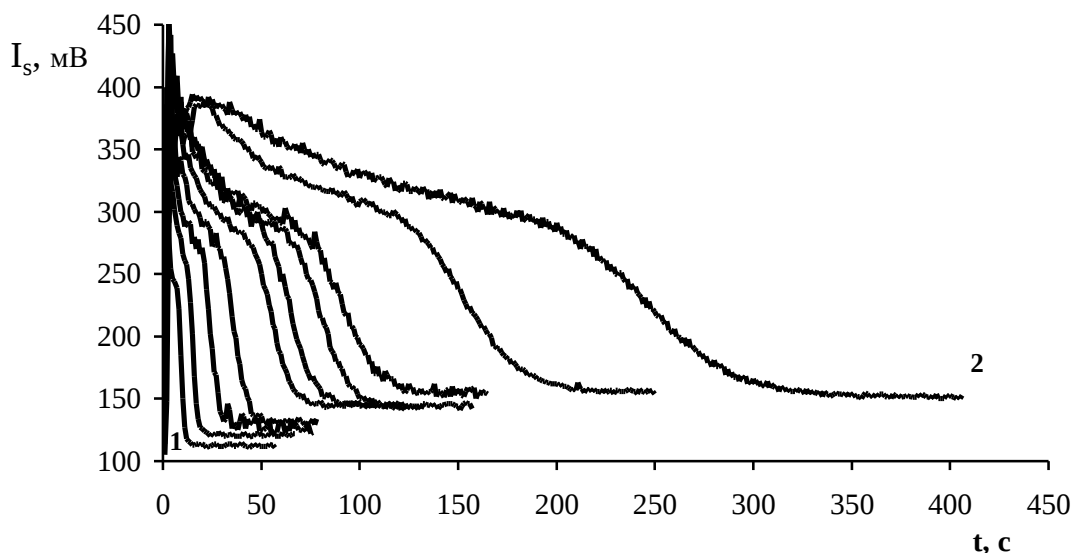


Рис. 5.13. Кінетичні криві гемолізу в 1М водному розчині ДМСО при температурах 37°C (1) – 3°C (2)

Молекули цих кріопротекторів відрізняються в першу чергу своїми фізико-хімічними властивостями. Молекули ДМСО є більш гідрофобними порівняно з молекулами 1,2-ПД: коефіцієнти розподілу цих речовин в системі "н-октанол - вода" становлять 0,247 та 0,076 відповідно [203]. Дослідження коефіцієнтів проникності в діапазоні температур 37-3°C показало, що коефіцієнти проникності мембран еритроцитів для ДМСО та 1,2-ПД при температурі 37°C вірогідно не відрізняються і становлять $(2,66 \pm 0,16) \cdot 10^{-6}$ м/с та $(2,82 \pm 0,11) \cdot 10^{-6}$ м/с відповідно. При температурі 3°C різниця між коефіцієнтами проникності зростає і стає вірогідною. Коефіцієнти проникності при цій температурі становлять $(0,096 \pm 0,015) \cdot 10^{-6}$ м/с для ДМСО та $(0,135 \pm 0,019) \cdot 10^{-6}$ м/с для 1,2-ПД. Середні енергії активації при апроксимації температурних залежностей в ареніусових координатах у всьому температурному діапазоні для трьох донорів становлять $71,34 \pm 2,65$ та $67,24 \pm 5,5$ кДж/Моль для ДМСО та 1,2-пропандіолу відповідно (рис.5.14, 5.15).

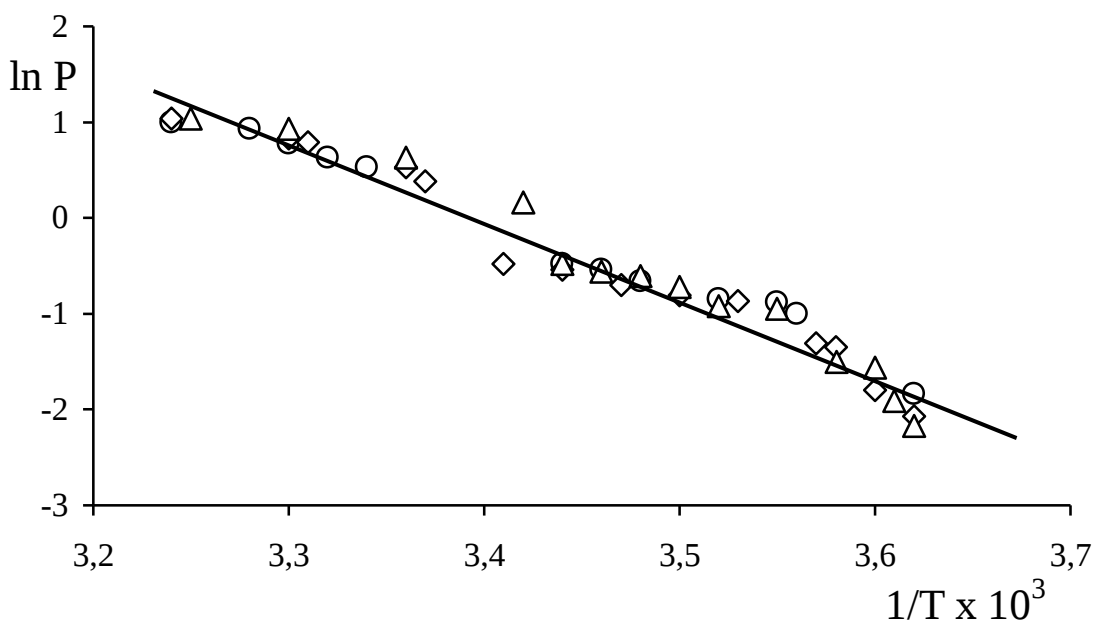


Рис. 5.14. Ареніусова залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для 1,2-ПД

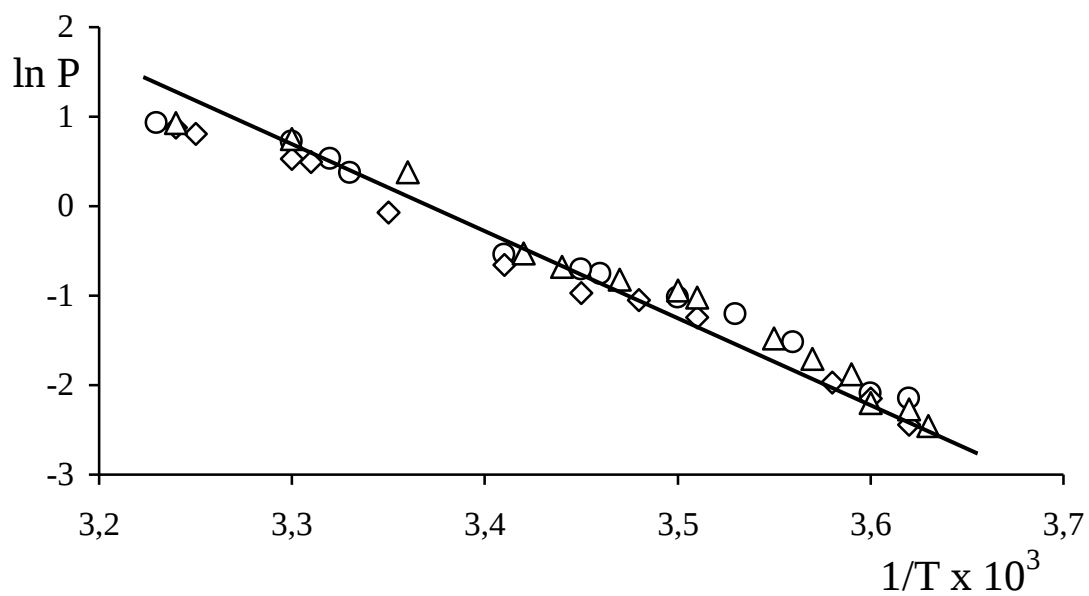


Рис. 5.15. Ареніусова залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для ДМСО

Такі значення видимої енергії активації свідчать про те, що проникання цих речовин, принаймні частково, відбувається крізь ліпідну фазу. Більша

величина енергії активації для ДМСО відображує той факт, що більша частина потоку цієї речовини, ніж у випадку 1,2-ПД, проникає крізь ліпідний бішар. Але різниця між видимими енергіями активації проникання цих кріопротекторів є не дуже великою. Це узгоджується з виміряними нами значеннями коефіцієнтів проникності нативних та проінкубованих з рСМBS еритроцитами. Так, якщо відсоток пригнічення проникності для 1,2-ПД становить 59% (табл.5.1), то у випадку ДМСО він становить 55% (середні значення коефіцієнтів проникності ДМСО при температурі 20°C для нативних та проінкубованих з сульфгідрильним реагентом еритроцитів є $1,37 \cdot 10^{-6}$ та $0,59 \cdot 10^{-6}$ м/с відповідно).

У зв'язку з тим, що усереднені значення величини видимої енергії активації є не дуже інформативними внаслідок впливу індивідуальних властивостей еритроцитів різних донорів на результати визначення характеристик цих клітин [27,221], а розкид параметрів може маскувати ефекти температури, ми проаналізували температурні залежності коефіцієнтів проникності для досліджуваних речовин для кожного донора окремо.

На рисунках представлені температурні залежності коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для 1,2-ПД (рис.5.16) та ДМСО (рис.5.17) в ареніусових координатах для кожного донора окремо. Аналіз результатів та апроксимація експериментальних точок в окремих температурних діапазонах свідчать про існування термоіндукованих змін енергії активації проникності еритроцитарних мембран при температурах 8-12°C, 18-20°C для обох досліджених речовин, а також 28-30°C для ДМСО та більш широкий діапазон 25-30°C для 1,2-ПД. Оскільки для всіх трьох донорів такі зміни є аналогічними, маємо всі підстави вважати, що отримані результати не є випадковими. З представлених ареніусових залежностей видно, що зміни енергії активації для 1,2-ПД є більш вираженими.

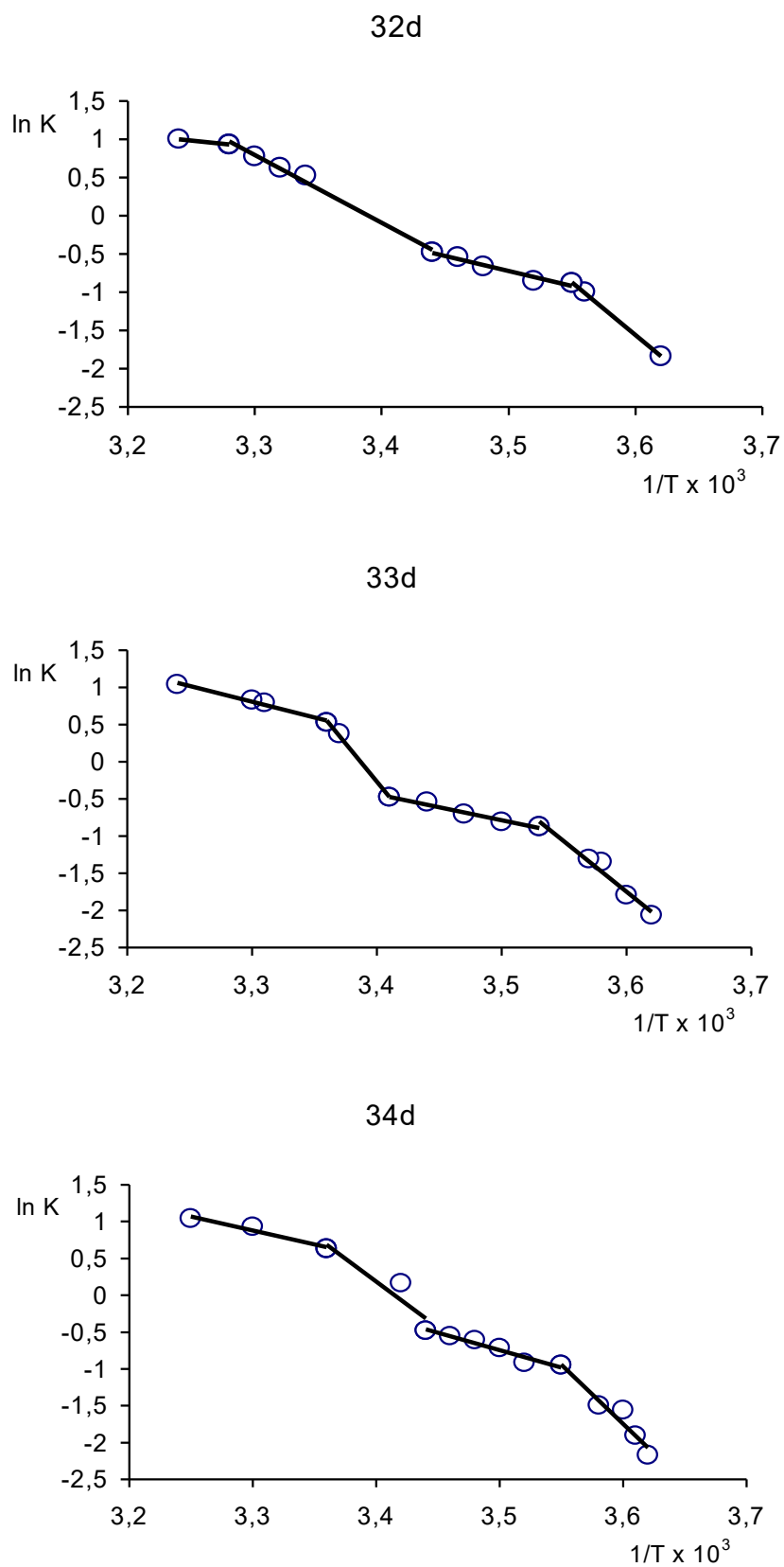


Рис. 5.16. Ареніусові залежності коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу

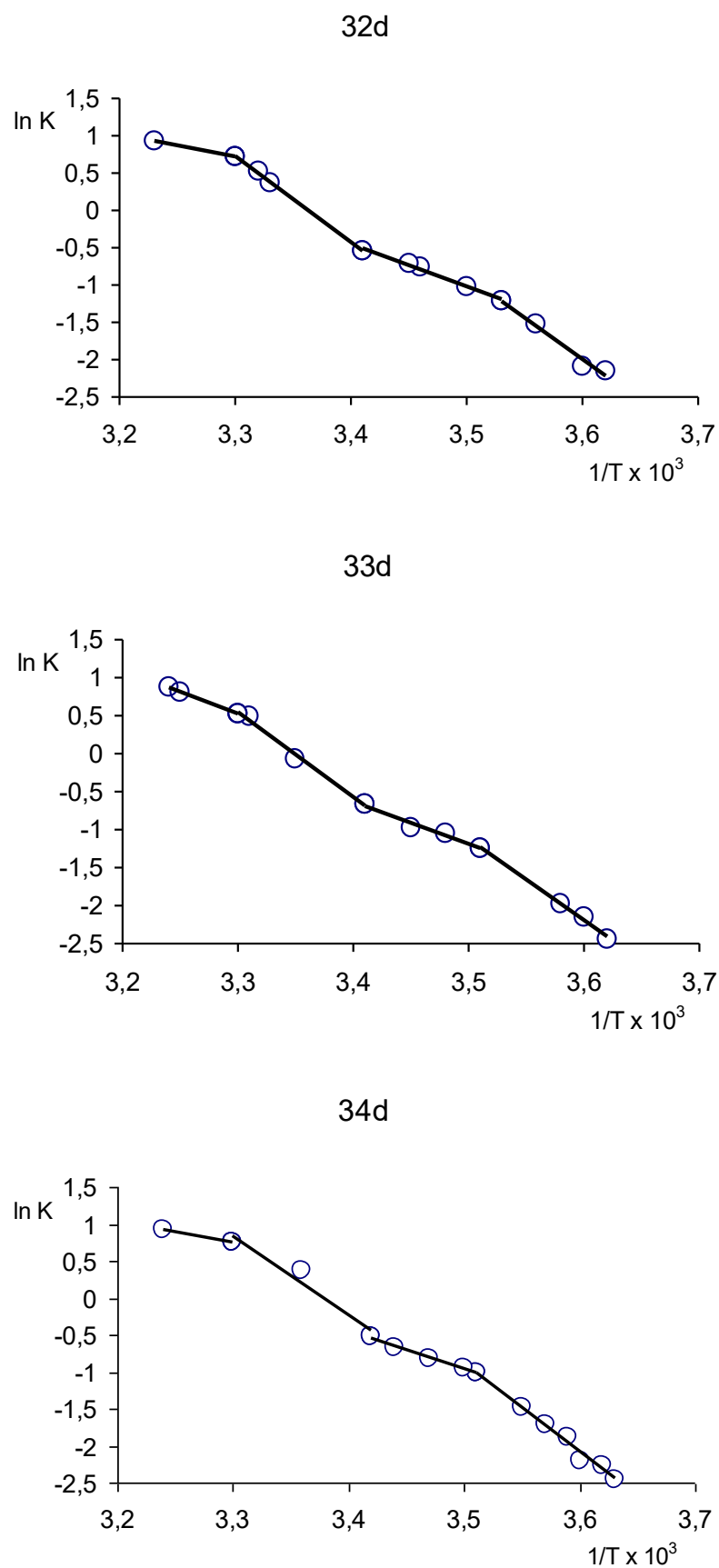


Рис. 5.17. Ареніусові залежності коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини для ДМСО.

Але вірогідність різниці енергій активації для всіх пар суміжних діапазонів температур для обох речовин становить 0,99. Задовільно збігаються також температури зламів ареніусових залежностей для всіх донорів (табл.5.6).

Таблиця 5.6

Енергія активації проникання 1,2-ПД та ДМСО крізь мембрани еритроцитів людини в різних температурних діапазонах.

Донор	1,2-ПД			ДМСО		
	Діапазон температур °С	Е _А , кДж/Моль	<Е _А > кДж/Моль	Діапазон температур °С	Е _А , кДж/Моль	<Е _А > кДж/Моль
32d	3-8	114,7	121,0±11,4	3-10	92,3	93,37±5,38
33d	3-10	114,2		3-12	88,6	
34d	3-9	134,2		3-12	99,2	
32d	8-18	32,7	33,8±4,6	10-20	48,4	45,8±2,9
33d	10-20	29,9		12-20	46,3	
34d	9-18	38,9		12-20	42,6	
32d	18-26	84,0	119,6±15,6	20-28	92,3	104,4±19,1
33d	20-25	171,0		20-28	94,5	
34d	18-25	103,8		20-25	126,4	
32d	26-32	56,1	46,6±8,2	28-30	79,0	58,9±17,6
33d	25-30	42,1		28-30	46,4	
34d	25-30	41,6		25-30	51,3	
32d	32-37	14,5	18,3±3,8	30-37	24,9	31,57±11,5
33d	30-37	22,2		30-37	44,9	
34d	30-37	18,3		30-37	24,9	

Отримані нами зміни в ході температурних залежностей пасивної проникності мембран еритроцитів людини до неелектролітів 1,2-ПД та ДМСО узгоджуються з величезною кількістю існуючих наразі експериментальних даних щодо впливу температури на біологічні системи взагалі та мембрани еритроцитів зокрема. Визначені температури зламів ареніусових залежностей лежать в інтервалах температур, відомих як критичні, в яких відбуваються зміни швидкостей багатьох біологічних процесів, пов'язаних з мембранами еритроцитів.

Різка зміна енергії активації процесу проникання неелектролітів в області 8-12°C корелює з численними даними про особливості температурних залежностей різних процесів в цій області температур. Методом ЕПР [151,153] показано, що при 10-12°C спостерігається злам ареніусової залежності частоти обертання йодацетамідної мітки, зв'язаної з SH-групами гідрофобних областей цитоскелетних білків еритроцитів. Це корелює з даними ареніусової залежності флюоресценції мембранних білків, що має злам при температурі 12°C [142]. Близьку до цього інтервалу температуру (15°C) вказують в роботі [143], як температуру зламу ареніусової залежності швидкості обмінної дифузії для Cl⁻. При дослідженні нами температурної залежності часу обміну молекул води еритроцитами [46] ми виявили, що в області температур 8-12°C графіки Ареніуса зазнають зламу із значним збільшенням енергії активації процесу при температурах нижче 8°C. Вимірювані значення коефіцієнтів проникності в діапазоні 8-12°C мали великий розкид, що вказує на перебудови в структурі мембран та її нестабільність за цих температур. Якщо прийняти до уваги, що існування білкових каналів, проникних для води та малих неелектролітів, зв'язують з аніонобінним білком смуги 3 [24], а також той факт, що периферичні білки актин-спектринового комплексу еритроцитів взаємодіють з інтегральним білком смуги 3 та з ліпідним бішаром [96,97,143], то можна вважати, що наявність зламу ареніусових залежностей в цій області температур для всіх зазначених вище процесів є проявом одних і тих самих перебудов в білок-ліпідному комплексі еритроцитарних мембран.

Енергія активації при температурах <8°C для проникання ДМСО є вірогідно меншою, ніж для 1,2-ПД. Очевидно, різке збільшення енергії активації проникання цих неелектролітів пов'язано із зменшенням доступності для них водних пор, а проникання ліпідними шляхами обумовлює менше значення енергії активації процесу для більш гідрофобних молекул ДМСО. В інтервалі ж температур 12-20°C значення енергії активації для 1,2-ПД є вірогідно меншим, ніж для ДМСО. В нашій роботі показано, що

при температурах біля 20°C існує два альтернативні шляхи, що є доступними для проникання обох типів молекул. Більша гідрофільність 1,2-ПД, очевидно, забезпечує меншу ефективну енергію активації при цій температурі, оскільки більша частка потоку 1,2-ПД проходить крізь водні білкові пори. Слід зазначити, що інтервал температур 12-20°C характеризується найменшими значеннями видимої енергії активації для обох речовин. Це може бути пов'язаним із значною дефектністю структури ліпідного бішару за цих температур внаслідок співіснування ліпідних доменів з різним фазовим станом. Тому, менша енергія активації для більш гідрофільного 1,2-ПД може також обумовлюватись прониканням по дефектах у ліпідному бішарі, заповнених молекулами води.

Багато робіт присвячено дослідженню змін структурно-функціональних параметрів мембран еритроцитів у діапазоні 18-20°C. При цих температурах спостерігаються злами на графіках Ареніуса транспорту глюкози в інтактних еритроцитах та їх тінях [146], зареєстровано злам на температурній залежності осмотичної стійкості еритроцитів [143]. З температурами 8-12°C та 20°C також тісно пов'язане явище гіпертонічного кріогемолізу (ГК). Green, Jung [156] показали, що для виникнення пошкоджуючої дії ГК температура, при якій здійснюється перша стадія цього процесу (витримка в гіпертонічному середовищі) повинна бути вище 20°C, а друга стадія (охолодження) нижче 15°C. Автори роботи [145] також зазначають, що ГК стає більш значним, якщо перед охолодженням еритроцити експонуються при температурі, вищій за 19°C, а охолоджуються до температури нижче 7°C. При цьому, величина ГК зростає при збільшенні температури експозиції від 19 до 30°C. В роботі [145] показано, що температурна залежність гіпотонічного гемолізу також має особливості при температурах близько 10°C та 20°C.

Ретельні дослідження цього феномену за допомогою різноманітних спинових міток і зондів показали, що незалежно від хімічної природи спинових радикалів, що використовувались в експериментах, критичні

температури як для ферментативної активності, так і для структурних змін в ліпідному бішарі реєструються в області температур 20°C [147]. Методом ЕПР було досліджено емпіричний індекс текучості мембран еритроцитів та ідентифіковано три температури, при яких відбуваються зміни рухливості спинові мітки 16-DSA - 8, 20 та 40°C. Автори роботи [145] вважають, що відповідальними за зміну резистентності еритроцитів до лізису є процеси латеральної фазової сепарації мембранних компонентів в діапазоні температур між 20 та 8°C. Вплив температури на структуру мембран викликає фактично, "не ідеальне" змішування компонентів мембрани, що спричинює появу пограничних областей. Порівняння цих даних літератури та отриманих нами температурних залежностей, які є узгодженими, вказує на те, що, дійсно, процеси латеральної фазової сепарації, що відбуваються в мембранах еритроцитів при зменшенні температури нижче 20°C набувають якісних змін в області 8-12°C з різким підвищенням величини видимої енергії активації процесу проникання речовин крізь мембрану.

Інтервали температур різкого збільшення енергії активації проникності 18-20°C та повторного її зменшення 25(28)-32°C задовільно збігаються з інтервалами температур посилення Н-зв'язків води (18-21°C) та їх послаблення (28-32°C), виявлених в системі вода-йони-білки в роботі [163] (рис.5.18.). Цей ефект може внести свої корективи в процес проникання неелектролітів крізь клітинні мембрани як у зв'язку зі змінами енергії взаємодії проникаючих молекул з їх гідратною оболонкою, так і змінами енергії міжмолекулярних взаємодій структурних компонентів самої мембрани. Менші зміни енергії активації для проникання ДМСО для всіх пар суміжних діапазонів температур можуть бути пов'язаними з більшою гідрофобністю ДМСО і внаслідок цього більшою часткою його потоку крізь загальну поверхню ліпідного бішару, а також більшим безпосереднім впливом ДМСО на водно-білково-ліпідні взаємодії в мембранах [151-153].

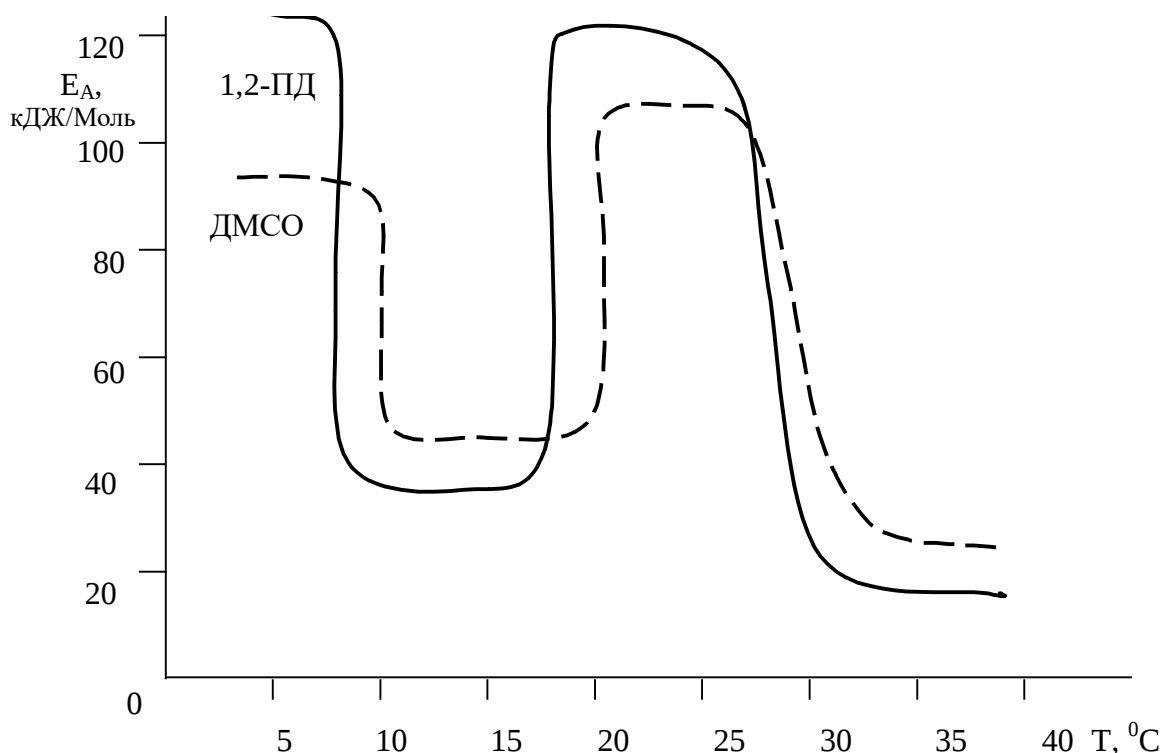


Рис. 5.18. Вплив температури на енергію активації проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів людини

Менша ефективна енергія активації для проникання 1,2-ПД в інтервалі 30-37°C також підтверджує той факт, що більша частка потоку 1,2-ПД проходить крізь водні білкові пори, енергія активації дифузії для яких є меншою, ніж для ліпідного бішару [27].

Отримані нами дані щодо різких змін видимої енергії активації процесу проникання неелектролітів крізь мембрани еритроцитів корелюють з даними роботи [149] автори якої показали, що проникність мембран еритроцитів до фарбника АНС зазнає ряд термоіндукованих змін. При цьому, в інтервалі температур 20-28°C величина енергії активації процесу добре відтворювалась в різних дослідках і мала достатньо великі значення, тоді як для діапазону температур 28-36°C варіювала для різних дослідів і мала низькі значення.

Слід зазначити, що залежність величини видимої енергії активації від температури в інтервалі 25-30-37°C є більш пологою, ніж в інших точках зламів (рис.5.18), що свідчить про безперервні поступові зміни у стані мембрани. Скоріше за все, це пов'язано із поступовим збільшенням текучості

мембрани з температурою без різких змін у фазовому стані ліпідів. Слід пам'ятати, що біологічні мембрани є багатокомпонентними системами. Згідно з правилом фаз Гібса [222, с.33-41] двокомпонентна система при існуванні двох фаз (наприклад, твердої та рідкої) має два ступеня свободи. Іншими словами, двокомпонентна система в загальному випадку не характеризується чітко вираженою температурою плавлення (тобто такою, що відповідає єдиній точці), оскільки при зміні температури в деяких межах в системі існує дві фази. Наприклад, у суміші дипальмітоїлфосфатидилхоліна (ДПЛ) 65%-діелаїдоїлфосфатидилхоліна (ДЕЛ) 35% при температурі 30°C існують дві фази : рідка, що містить 45% ДПЛ, та тверда, що містить 85% ДПЛ. За іншої температури і того ж загального складу суміші також існують рідка та тверда фази, але їх склад відрізняється від такого при температурі 30°C. Отже, багатокомпонентна система не тільки “плавиться” в широкому температурному інтервалі, але і за різних температур має різний склад твердої та рідкої фази. Важливою особливістю багатокомпонентної системи є явище розділення фаз, при якому кожна з фаз збагачується певним компонентом.

Біологічне значення цієї особливості очевидне: якщо б біологічні мембрани були побудовані із ліпідів одного виду, мембрана мала б різку температуру плавлення, і організм міг би відповідати на коливання температури зміною стану і, отже, функції мембрани тільки за принципом “все-або-нічого”. Але завдяки багатокомпонентному складу мембрана може зазнавати поступових змін ступеня текучості в широкому інтервалі температур, забезпечуючи набагато більш “тонкий” контроль за функцією клітини у відповідності до температури оточуючого середовища.

Отже, в цілому, отримані температурні залежності пасивної проникності мембран еритроцитів людини до неелектролітів можна інтерпретувати таким чином. При зниженні температури середовища від фізіологічного (тобто від 37°C) текучість мембрани поступово зменшується, що викликає поступове збільшення енергії активації пасивного проникання

неелектролітів крізь ліпідний бішар. Енергія активації набуває при цьому найбільшого значення в інтервалі температур 25-20°C. Очевидно, що при температурі 20°C цей процес переходить з кількісної фази в якісну. Різке зменшення енергії активації пасивного проникання неелектролітів при цій температурі може бути наслідком розділення фаз в багатокомпонентній фофоліпідній системі, на яку вказують і автори роботи [145]. Цей процес приводить до появи дефектів упаковки ліпідних молекул на границях розділу фаз, а, отже, і до збільшення проникності. Енергія активації в діапазоні 20-12°C набуває низьких значень. Повторне ж різке збільшення енергії активації пасивного проникання електронеітральних молекул при температурах 12-8°C пов'язано з глобальним структурним переходом в мембранах еритроцитів, в який залучені всі компоненти мембрани як ліпідні, так і білкові. При цьому структурний перехід торкається як периферійних білків цитоскелетного комплексу, так і інтегральних білків мембрани, зокрема білка смуги 3, що пов'язаний як з білками цитоскелету через білок смуги 4.1 [143], так і з ліпідами. Залучення до структурного переходу, що відбувається в інтервалі температур 12-8°C, інтегрального білка смуги 3 призводить, очевидно, до різкого зменшення проникності по білкових каналах, або зовсім усуває цей шлях проникання малих електронеітральних молекул. Існування різкого зламу ареніусових залежностей в цьому діапазоні температур і для проникання молекул води [46] узгоджується з такою інтерпретацією.

Таким чином, проведені дослідження температурної залежності проникності мембран еритроцитів людини для молекул неелектролітів свідчать про складний характер процесів взаємодії мембран з проникаючими речовинами, що обумовлено як структурою мембран та фізико-хімічними властивостями молекул цих речовин, так і їх взаємодією з водним середовищем.

5.6. Висновки

В результаті проведених досліджень за розробленим нами методом визначено коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для діолів (етиленгліколю, ді- та триетиленгліколю, двох ізомерів пропандіолу, чотирьох ізомерів бутандіолу), амідів (ацетаміду, метилацетаміду, диметилформаміду та диметилацетаміду), гліцерину та його моноалкілових ефірів (1-ММЕГ, 1-МЕЕГ, 1-МПЕГ) (всього для 18 речовин). Досліджено механізми проникання цих речовин з використанням блокатора білкових каналів (pCMBS). Показано, що досліджені речовини проникають в еритроцити як крізь білкові гідрофільні пори сталого розміру, утворені інтегральним білком смуги 3, так і крізь ліпідний бішар. Ступінь проникання молекул тим чи іншим шляхом залежить від їх фізико-хімічних і геометричних параметрів. Проникання молекул крізь білкові гідрофільні канали характеризується критичною залежністю від діаметра молекул. Якщо цей параметр перевищує величину 4 Å коефіцієнт проникності крізь пори різко зменшується. Про проникання ліпідним шляхом свідчить сильна кореляція проникності діолів та амідів крізь мембрани еритроцитів, проінкубованих з pCMBS, з коефіцієнтами розподілу в системі “n-октанол÷вода” (коефіцієнт кореляції 0,94-0,99). Для проникання цим шляхом характерна також обернена залежність від об’єму проникаючих молекул.

Молекули гліцерину, незважаючи на його виняткову гідрофільність, не проникають крізь білкові гідрофільні пори через стеричні обмеження. Порівняння проникностей нативних та проінкубованих з сульфгідрильним реагентом еритроцитів для гліцерину та його моноалкілових ефірів свідчить про те, що причиною цього є не тільки розміри самої молекули гліцерину, але і її гідратної оболонки.

Проведено теоретичний розгляд проникання малих прямоланцюгових молекул крізь білкові пори сталого розміру. Теоретичні розрахунки в

сукупності з отриманими експериментальними результатами свідчать про те, що проникання досліджених молекул неелектролітів крізь білкові канали здійснюється разом з молекулами води, що утворюють їх гідратну оболонку. Розраховані при цьому припущенні значення коефіцієнтів проникності крізь білкові канали для низки досліджених речовин цілком задовільно узгоджуються з експериментальними даними.

Досліджено вплив температури на проникання 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду крізь мембрани еритроцитів людини. Аналіз результатів та апроксимація експериментальних точок в ареніусових координатах в окремих температурних діапазонах свідчать про існування термоіндукованих змін енергії активації проникності еритроцитарних мембран при температурах 8-12°C, 18-20°C та 28(25)-30°C. Визначені температури зламів ареніусових залежностей лежать в інтервалах температур, відомих як критичні, в яких відбуваються зміни швидкостей багатьох біологічних процесів, пов'язаних з мембранами еритроцитів. Існування різкого зламу ареніусових залежностей проникностей в діапазоні температур 8-12°C підтверджує зв'язок шляхів проникання досліджених молекул з білком смуги 3.

Отримані результати підтвердили високу чутливість розробленого методу визначення коефіцієнтів проникності еритроцитів для електрично нейтральних речовин, який забезпечує адекватну оцінку досліджуваного параметру, реєструючи тонкі зміни в перебігу складних процесів проникання молекул крізь біологічні мембрани.

РОЗДІЛ 6

РОЗПОДІЛ ЕРИТРОЦИТІВ У ПОПУЛЯЦІЇ ЗА ІНДЕКСОМ СФЕРИЧНОСТІ

Важливою характеристикою червоних кров'яних клітин є їх унікальна форма, яка забезпечує найкращі умови для обміну киснем та інших метаболітів з оточуючим середовищем і проходження цих клітин крізь найменші капіляри в циркуляційному руслі. Геометрія еритроцита та його здатність до деформації тісно пов'язана з віком самої клітини та зі станом здоров'я людини. Впродовж життя клітини однією з найважливіших задач її функціональних систем є підтримка внутрішньоклітинного іонного складу і пов'язаної з ним первісної форми клітини. Очевидно, що, оскільки в руслі крові циркулюють еритроцити різного віку, форма клітин в популяції не є однаковою і характеризується певною функцією розподілу. Одним з простих, але й інформативних, показників осмотичного статусу еритроцитів є їх осмотична крихкість. Аналіз розподілу еритроцитів за осмотичною стійкістю має вікову історію. Ще в 1886 році М.В.Яновським був запропонований перший метод визначення відмінностей еритроцитів за резистентністю. Це був один з найперших методів, який дозволяв отримати розподіл еритроцитів за певним параметром, а не тільки отримати середню характеристику. Сутність методу полягала в підрахунку зменшення кількості еритроцитів в низці розчинів з тоничністю, що знижується. Але в зв'язку з великою трудомісткістю методу, який включав багаторазовий підрахунок числа еритроцитів під мікроскопом, він не знайшов широкого застосування. Розвиток фізичних методів досліджень в біології та медицині дозволив знов повернутись до ідеї про диференційованість еритроцитів за стійкістю, але вже на іншому методичному рівні [223]. Оскільки в осмотичному методі вимірювання проводили після закінчення гемолізу в низці розчинів, що все ще потребувало багато часу, більшого поширення набув метод реєстрації

кінетики гемолізу під дією кислоти в стабільних умовах [224,225]. Було показано, що кислотна стійкість еритроцита є величиною, пов'язаною з його фізіологічним станом і віком. Розподіл еритроцитів за стійкістю характеризує якісний склад червоної крові. Найбільшу кислотну стійкість мають молоді еритроцити, найменшу - старі. Численні дослідження показали, що еритрограма, побудована на вимірюванні стійкості еритроцитів периферійної крові, відображає діяльність органів продукції та деструкції цих клітин, тобто характеризує стан еритрона в цілому. В той же час треба відзначити, що кислотна еритрограма, хоча і є інформативною характеристикою популяції еритроцитів, не має прозорого фізичного або фізіологічного сенсу. Осмотична ж резистентність є більш зрозумілою в аспекті кількісної інтерпретації. З погляду ж кріобіології ця характеристика набуває ще більш вагомого сенсу, оскільки осмотичні сили є одними з найважливіших пошкоджуючих чинників на більшості етапів кріоконсервування [15]. З появою кріобіології як науки багато робіт було присвячено впливу осмотичних чинників на клітини. Найбільш експериментально вивченим є вплив гіпертонії на біологічні об'єкти, оскільки клітини потрапляють в гіпертонічні умови на перших же етапах заморожування. Впливу гіпотонічного середовища в процесі кріоконсервування було приділено менше уваги, оскільки цей чинник є менш очевидним. Але на етапі розморожування клітини так само опиняються в гіпотонічних умовах, як на етапі заморожування – в гіпертонічних. Гіпотонія може мати місце і на етапі переливання розмороженої крові.

Нами було розроблено метод визначення осмотичної крихкості еритроцитів методом малокутового розсіювання світла клітинною суспензією [226]. Використання методу малокутового розсіювання світла для вимірювання відсотку негемолізованих клітин в суспензії забезпечує більшу точність визначення досліджуваних величин і значно спрощує і прискорює процедуру отримання кривих осмотичної крихкості. Фізико-математичний аналіз процесу гемолізу еритроцитів в гіпотонічному розчині непроникаючої

речовини дозволяє отримати фізично ясну інформативну інтерпретацію експериментальних кривих осмотичної крихкості і розширює коло застосування цієї характеристики. На підставі фізико-математичної моделі процесів масопереносу через мембрани клітин, вміщених в гіпотонічний розчин непроникаючої речовини, та експериментальних кривих осмотичної крихкості розроблено метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності [193,226].

6.1. Теоретичне обґрунтування методу визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності

У фізіологічних умовах еритроцит має об'єм, значно менший за максимально можливий, тобто сферичний, при заданій площі поверхні його мембрани S_0 . В нормальних умовах в мембрані еритроциту або зовсім відсутні деформації, або в ній є незначні (в порівнянні з ізотропним натягом) деформації згинання [227-229]. Про відсутність деформації розтягу в мембранах еритроцитів в нормальних умовах, зокрема, свідчить відсутність трансмембранного перепаду гідростатичного тиску [230]. Але, якщо клітину помістити в розчин, в якому осмотичний тиск не проникаючої крізь клітинну мембрану речовини є меншим за осмотичний тиск фізіологічного розчину, то, як відомо [231], з часом, під дією осмотичних сил, її об'єм перевищить первісне значення V_0 і насамкінець досягне значення:

$$V_{\infty} = V_0 \left(\alpha + \frac{(1-\alpha)\pi_0}{\pi^{out}} \right) \quad (6.1)$$

де α - об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин. При зменшенні осмотичного тиску позаклітинної непроникаючої речовини

об'єм клітини буде досягати все більших значень. Але доти, поки еритроцит не перетвориться у сферу, тобто при

$$V_{\infty} < \frac{S_o^{3/2}}{6\sqrt{\pi}} = V_{cf} \quad (6.2)$$

в його мембрані будуть відсутні значні напруження.

Є загальноприйнятим, що на стадії набрякання при зміні форми еритроцита від первісної до сферичної площа поверхні мембран еритроцитів не змінюється і дорівнює вихідному значенню S_0 . Якщо ж

$$\frac{\pi^{out}}{\pi_0} < \frac{1 - \alpha}{(V_{cf}/V_o) - \alpha} \quad (6.3)$$

і отже $V_{\infty} > V_{cf}$.

Аналіз осмотичної поведінки еритроцита в гіпотонічному розчині непроникаючої речовини ґрунтується на фізико-математичному моделюванні процесів масопереносу крізь мембрану клітин. Як відомо [15], зміна об'єму клітини V з часом в неізотонічному розчині непроникаючої речовини, наприклад хлориду натрію, описується рівнянням:

$$\frac{dV}{dt} = SL_p \left[\pi_0^{in} \frac{V_0 - V_n}{V - V_n} - \pi^{out} - \Delta P \right] \quad (6.4)$$

де S і L_p – площа поверхні і коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани,

π_0^{in} і V_0 – початкове значення сумарного осмотичного тиску внутрішньоклітинних речовин і об'єму клітини,

π^{out} – осмотичний тиск позаклітинного розчину,

V_n – об'єм, який займає в клітині осмотично неактивна речовина,

ΔP – перепад тиску на мембрані клітини (тиск всередині клітини мінус атмосферний).

Вносячи нові змінні (відносний об'єм клітини $y=V/V_0$ і приведений осмотичний тиск $\hat{\pi}^{out} = \pi^{out} / \pi_0^{in}$) і нові параметри ($\alpha=V_n/V_0$ – об'ємна частка

осмотично неактивних речовин всередині клітини, $\tau_0 = \left(\frac{S}{V_0} L_p \pi_0^{in} \right)^{-1}$ -

характерний час обміну водою між клітиною і оточуючим її розчином) можна подати рівняння (6.4) у вигляді

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau} \left(\frac{1-\alpha}{y-\alpha} - \hat{\pi} - \frac{\Delta P}{\pi_0^{in}} \right) \quad (6.5)$$

Для еритроцитів людини, які порівняно з іншими клітинами мають аномально високе значення поверхнево-об'ємного відношення S_0/V_0 і коефіцієнту фільтрації L_p , $\tau_0 \cong 10^{-2}$ с. Тому через невеликий проміжок часу (практично миттєво) відносний об'єм еритроцита в розчині з осмотичним тиском π^{out} досягає стаціонарного значення

$$y_{\infty} = \alpha + \frac{1-\alpha}{\hat{\pi}^{out} + \frac{\Delta P_{\infty}}{\pi_0^{in}}} \quad (6.6)$$

Оскільки об'єм позаклітинного розчину в наших експериментальних умовах значно перевищує об'єм вміщених в нього еритроцитів $\hat{\pi}^{out}$ можна вважати незмінним і рівним його початковому значенню $\hat{\pi}^{out} = \hat{\pi}^{out}(0)$. В гіпотонічному розчині не проникаючої в клітини речовини, тобто при $\hat{\pi}^{out} < 1$, об'єм клітини збільшується в порівнянні з його первісним значенням, так що $y_{\infty} > 1$ за рахунок обводнення клітини. Якщо навіть в початковий момент часу форма клітини відрізняється від сферичної, то з

часом із збільшенням об'єму клітини вона може набути сферичної форми. До того часу, як еритроцит набуває сферичної форми, площа його мембрани залишається незмінною і рівною первісному значенню S_0 , а перепадом тиску на мембрані ΔP можна знехтувати. З простих геометричних міркувань випливає, що відносний об'єм y_s , при якому еритроцит перетворюється у сферу, визначається рівністю

$$y_s = P_0 = \frac{V_{c\phi}}{V_0} = \frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi}V_0} \quad (6.7)$$

де P_0 ми називаємо індексом сферичності еритроцита в первісному стані.

Приведений осмотичний тиск позаклітинного розчину, за якого еритроцит, що обводнюється, перетворюється у сферу, якщо в первісному стані площа його мембрани дорівнювала S_0 і об'єм клітини становив V_0 , є рівним

$$\hat{\pi}_s^{out} = \frac{1 - \alpha}{\frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi}V_0} - \alpha} \quad (6.8)$$

Якщо $\hat{\pi}^{out} < \hat{\pi}_s^{out}$, то мембрана еритроцита, котрий перетворився у сфероцит і обводнюється далі, зазнає ізотропного розтягу. Оскільки при цьому площа поверхні клітинної мембрани S неминуче перевищить первісне значення $S > S_0$, то у відповідності із законом Гука в мембрані еритроцита виникає ізотропний натяг [185]

$$\sigma = \Gamma \left(\frac{S - S_0}{S_0} \right) \quad (6.9)$$

де S – поточне значення площі поверхні сфероцита,

Γ – ізотермічний модуль поверхневого розтягу мембрани еритроцита, який за даними літератури [185] становить 0,42 Н/м.

За певного значення ізотропного розтягу в мембрані утворюється розрив у вигляді пори, що має макроскопічний розмір (тобто розмір, що значно перевищує відстань між молекулами в мембрані) [232]. Ізотропний натяг мембрани пов'язаний з перепадом тиску на ній співвідношенням

$$\Delta P = \frac{2\sigma}{R_s} \quad (6.10)$$

де R_s – радіус недеформованого сфероцита.

При невеликих розтягах мембрани $(y-y_s)/y_s \ll 1$ закон Гука (6.6) можна подати у вигляді

$$\sigma = \frac{2\Gamma(y-y_s)}{3y_s} \quad (6.11)$$

З урахуванням (6.10) та (6.11) співвідношення (6.6) можна представити у вигляді

$$y_\infty - y_s = \left\{ -y_s + \alpha - \frac{3R_s \hat{\pi}^{out} \pi_0^{in} y_s}{4\Gamma} \pm \sqrt{\left(y_s - \alpha - \frac{3R_s \hat{\pi}^{out} \pi_0^{in} y_s}{4\Gamma} \right)^2 + \frac{3\pi_0^{in} R_s (1-\alpha) y_s}{\Gamma}} \right\} \frac{1}{2} \quad (6.12)$$

Тепер, знову враховуючи (6.11), за допомогою (6.12) знаходимо залежність ізотропного натягу мембрани еритроцита від осмотичного тиску позаклітинного розчину і параметра y_s :

$$\sigma(\hat{\pi}^{out}, y_s) = \frac{\Gamma}{3y_s} \times \left\{ -y_s + \alpha - \frac{3R_s \hat{\pi}^{out} \pi_0^{in} y_s}{4\Gamma} \pm \sqrt{\left(y_s - \alpha - \frac{3R_s \hat{\pi}^{out} \pi_0^{in} y_s}{4\Gamma} \right)^2 + \frac{3\pi_0^{in} R_s (1-\alpha) y_s}{\Gamma}} \right\} \quad (6.13)$$

Середній час утворення макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані розглянуто нами в розділі 4.2. Він визначається виразом

$$\langle t \rangle = \text{const} \frac{(kT)^{3/2}}{\sigma^{1/2}} \exp \frac{\pi \gamma^2}{kT \sigma} \quad (6.14)$$

де k – постійна Больцмана,

T - абсолютна температура,

γ - лінійний натяг межі макроскопічної мембранної пори.

Слід особливо відзначити ту обставину, що у відповідності з (6.14) будь який, навіть невеликий, ізотропний натяг мембрани еритроцита приводить до його гемолізу. При більшому ізотропному розтягу мембрани гемоліз настає швидше, ніж при меншому, але все-таки настає при спливанні достатньо великого проміжку часу. Отже, оскільки ізотропний натяг мембрани виникає як тільки $y > y_s$, то можна твердити, що в гіпотонічному розчині не проникаючої в еритроцити речовини після достатньо тривалої експозиції в ньому гемолізують всі клітини, для яких $y_s < y_\infty$. Оскільки в

суспензії еритроцитів вже в первісному стані параметр $P_0 = \frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi}V_0}$ не має

однакового значення для різних клітин, то, як витікає з (6.14) з урахуванням (6.11), в першу чергу гемолізують еритроцити з меншим значенням параметра y_s , а потім починається гемоліз клітин з більшим значенням цього параметра. Більше того, може виявитись, що при заданому осмотичному

тиску позаклітинного розчину не всі клітини перетворюються у сфероцити, і тому вони зовсім не зазнають гемолізу.

Таким чином, розподіл параметра y_s в популяції еритроцитів суттєвим чином позначається на кінетиці гемолізу суспензії еритроцитів в гіпотонічному розчині не проникаючої в клітини речовини і повинен враховуватись при аналізі експериментальних даних. Щоб знайти функцію розподілу параметра y_s в популяції еритроцитів того чи іншого донора, використаємо ту обставину, що експериментальні дані визначення осмотичної крихкості еритроцитів в серії гіпотонічних розчинів дозволяють визначати частку еритроцитів, що гемолізували при спливанні достатньо великого проміжку часу, в залежності від приведенного осмотичного тиску позаклітинного розчину для кожного донора. Оскільки при цьому гемолізу зазнають всі клітини, для яких $y_s < y_\infty$, за цими експериментальними даними можна визначити частку еритроцитів у дослідженому зразку, значення параметра y_s для яких не перевищує або перевищує значення

$$y^* = \alpha + \frac{1 - \alpha}{\pi^{out}} \quad (6.15)$$

$$\frac{N(y_s < y^*)}{N_{повне}} = f(\hat{\pi}^{out}) \quad (6.16)$$

де $N(y_s < y^*)$ – число еритроцитів в досліджуваній суспензії, значення параметру y_s для яких не перевищує значення y^* ,

$N_{повне}$ – повне число еритроцитів в суспензії.

З експериментальних залежностей осмотичної крихкості (тобто залежності частки еритроцитів, що не зазнали гемолізу, від осмотичного тиску позаклітинного середовища) за допомогою рівнянь (6.15) та (6.16) отримуємо функцію розподілу параметра y_s в популяції еритроцитів даного донора, переходячи від аргументу $\hat{\pi}^{out}$ до аргументу y^*

$$\frac{N(y_s \leq y^*)}{N_{повне}} = \varphi(y_s) \quad (6.17)$$

Диференціюючи (6.17) по y_s , отримуємо відповідні щільності розподілу параметра y_s в популяції еритроцитів відповідного донора.

Знаючи функцію розподілу параметра y_s в популяції еритроцитів певного донора, можна визначити час напівгемолізу суспензії еритроцитів цього донора в залежності від приведенного осмотичного тиску позаклітинного розчину $\hat{\pi}^{out}$. При заданому осмотичному тиску позаклітинного розчину $\hat{\pi}^{out}$ гемолізу зазнають всі еритроцити, для яких $y_s < y^* = \alpha + (1 - \alpha) / \hat{\pi}^{out}$. По відомому експериментальному розподілу можна визначити частку клітин $N^*/N_{повне}$, яка гемолізує в даному зразку при спливанні достатньо великого проміжку часу. Оскільки в зразку почергово гемолізують клітини, починаючи з менших значень y_s , то, очевидно, напівгемоліз в зразку відбувається в той момент, коли прогемолізують еритроцити із значенням параметра $y_s = y_{1/2}$, котрий відповідає значенню ординати на графіку розподілу $N^*/2$. У відповідності з формулами (6.14) і (6.11) час напівгемолізу даного зразка можна визначити як

$$\langle t \rangle_{1/2} = \text{const} \frac{(kT)^{3/2}}{\sigma^{1/2}} \exp \frac{\pi \gamma^2}{kT \frac{2\Gamma}{3y_s} (y_\infty - y_{1/2})} \quad (6.18)$$

де y_∞ визначається формулою (6.12) при $y_s = y_{1/2}$.

Таким чином, знаходимо залежність часу напівгемолізу досліджуваного зразка крові в залежності від осмотичного тиску позаклітинного розчину.

Наведений теоретичний розгляд процесу гіпотонічного гемолізу в розчинах не проникаючої крізь мембрану речовини дозволяє проаналізувати експериментальні криві осмотичної крихкості і отримати з цих

експериментальних даних криві щільності розподілу еритроцитів в популяції того чи іншого донора за індексом сферичності. Визначення частки клітин, що гемолізують в певному гіпотонічному розчині методом малокутового розсіювання, надає додаткову можливість отримати кінетику гемолізу еритроцитів в даному розчині і порівняти час напівгемолізу з розрахованим теоретично.

6.2. Експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності

Експериментально визначаючи, що при осмотичному тиску позаклітинного розчину $\hat{\pi}^{out}$ прогемолізувала частка клітин $h = \varphi(y_s)$ (6.17), ми тим самим визначаємо частку еритроцитів, первісне значення індексу сферичності котрих було меншим, ніж $y_\infty = \alpha + \frac{1-\alpha}{\hat{\pi}^{out}}$. Диференціюючи функцію $\varphi(y_s)$ по аргументу, знаходимо відповідну щільність розподілу індексу сферичності в досліджуваній популяції еритроцитів.

Розробленим методом нами було досліджено розподіл еритроцитів за індексом сферичності в популяціях здорових дорослих донорів. Для цього реєстрували кінетичні криві гемолізу еритроцитів в розчинах хлористого натрію з тонічностями що знижувались від ізоосмотичної (приведений осмотичний тиск $\hat{\pi}^{out} = 1$) до таких, що викликали гемоліз всіх еритроцитів в популяції ($\hat{\pi}^{out} = 0,2[2]$). Еритроцити виділяли з консервованої крові, отриманої на Харківській обласній станції переливання крові. Звичайно, не можна стверджувати, що всі зразки крові були отримані від абсолютно здорових донорів. Але з усіх досліджених зразків (понад 50) у приблизно 80% випадків розподіл еритроцитів за індексом сферичності мав вигляд, близький до Гаусового і характеризувався гладким перебігом кривої з одним максимумом. В решті випадків розподіли були полімодальними або асиметричними.

На рис.6.1-6.8 представлено диференційні криві, що відображають щільність розподілу клітин за індексом сферичності. Дослідження показали, що дана характеристика варіює для різних донорів, відбиваючи таким чином стан популяції еритроцитів окремого донора.

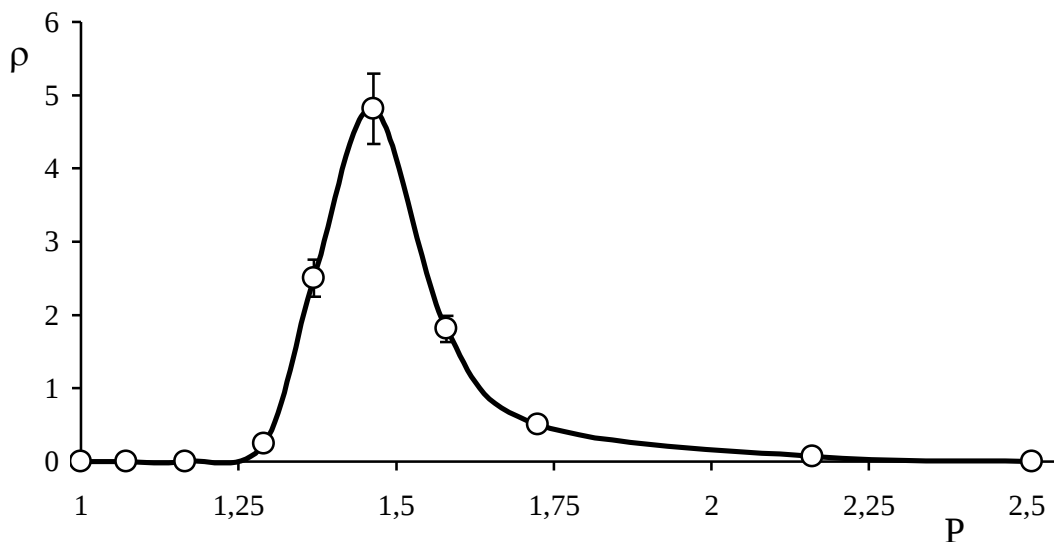


Рис. 6.1. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 36d

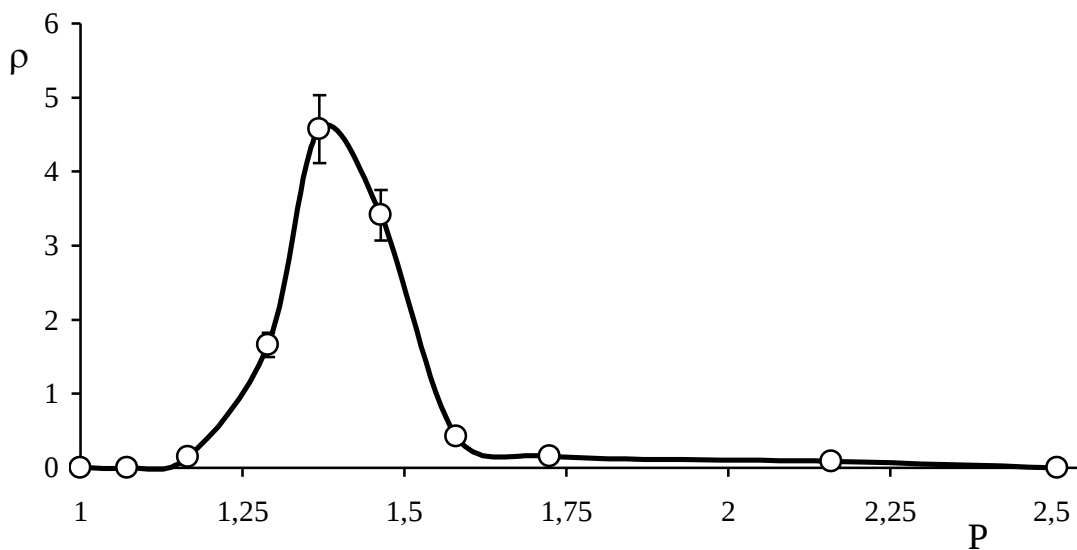


Рис. 6.2. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 37d

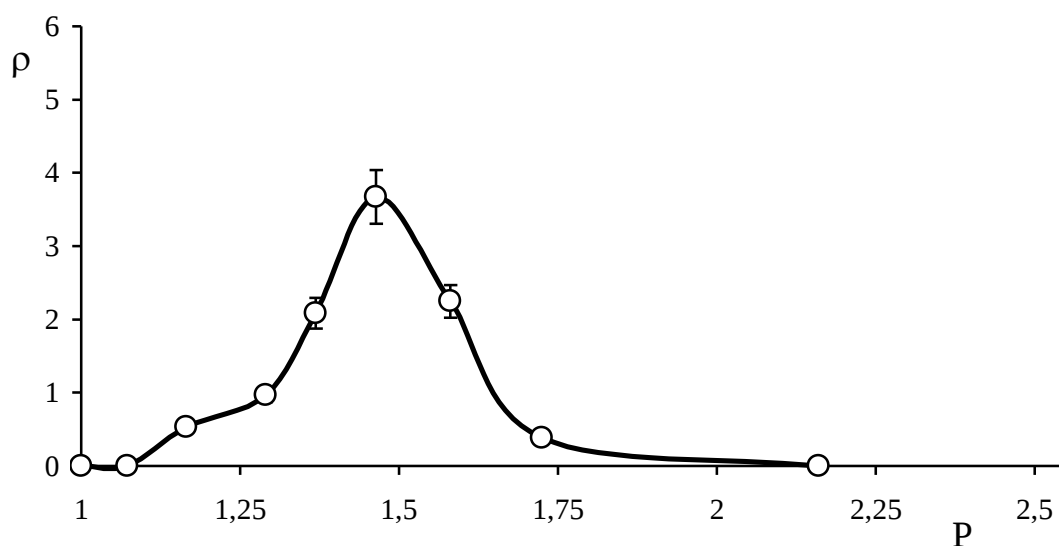


Рис. 6.3. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 38d

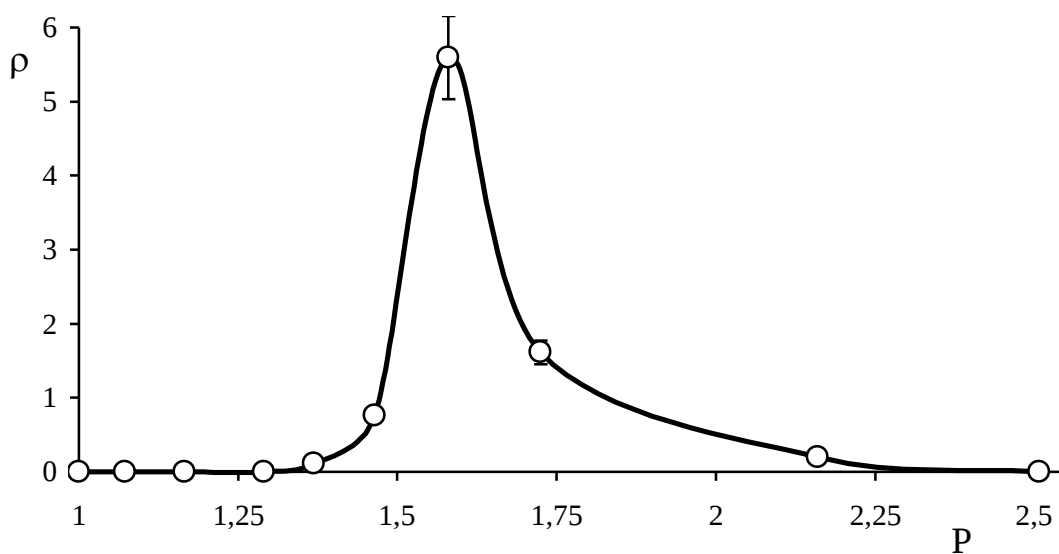


Рис. 6.4. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 40d

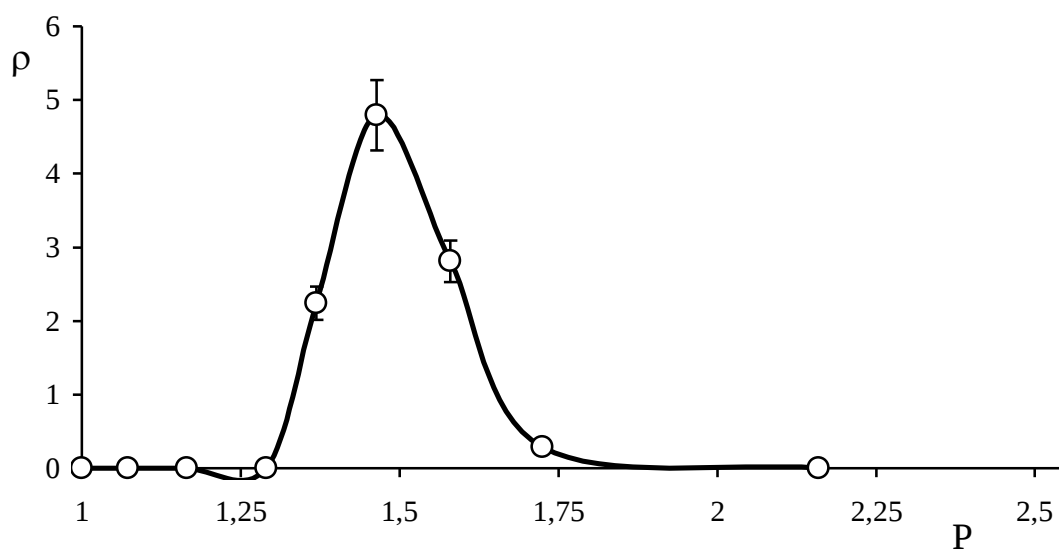


Рис. 6.5. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 44d

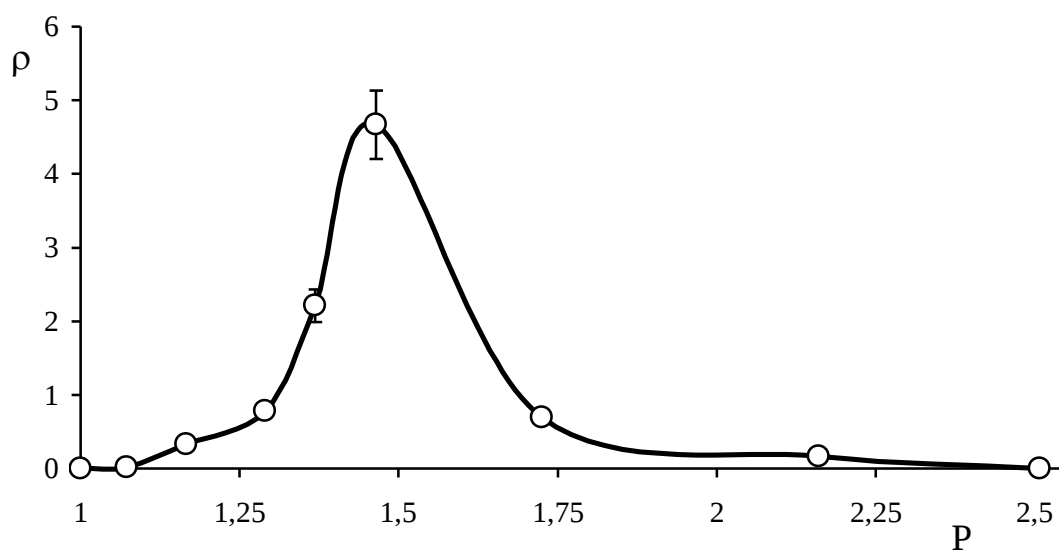


Рис. 6.6. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 59d

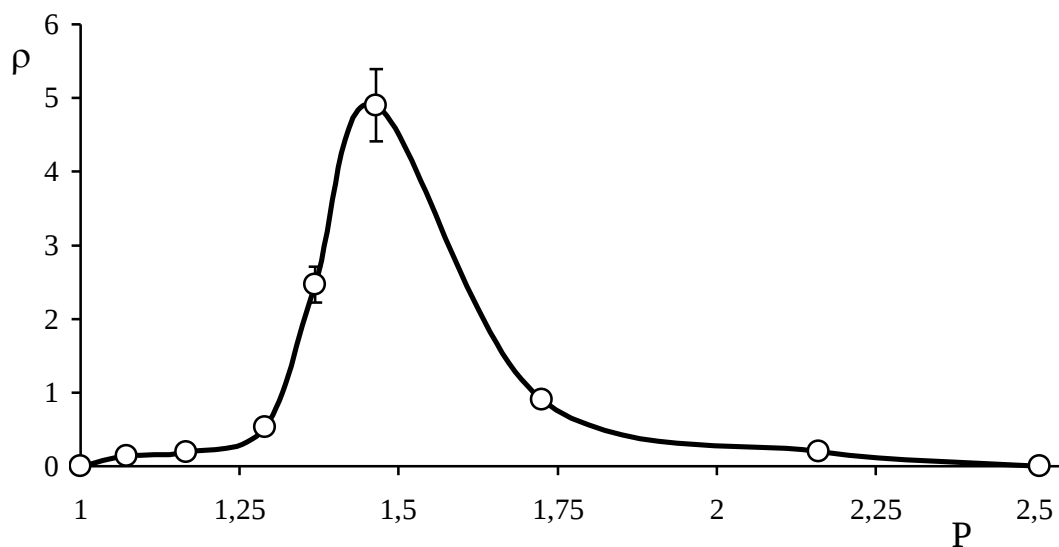


Рис. 6.7. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 60d

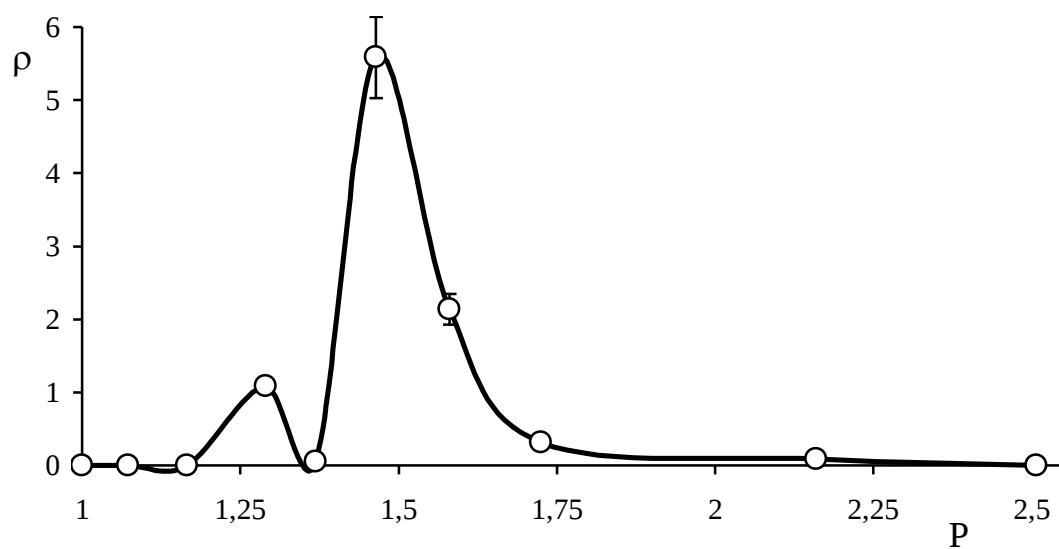


Рис. 6.8. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 45d

Максимальну питому вагу мають клітини з індексом сферичності в інтервалі від 1.38 до 1.58. Одержані чисельні значення індексів сферичності центрів розподілів відповідають відомим з літератури величинам об'єму та площі поверхні мембран еритроцитів. Так, за даними різних авторів площа поверхні еритроцитів знаходиться в діапазоні 120-155 $\mu\text{м}^2$, а об'єм - у діапазоні 90-93 $\mu\text{м}^3$ [19,233]. Тоді значення індексів сферичності найбільшої частки еритроцитів будуть знаходитись в межах 1.22-1.57. Побудована за даними для 8 донорів усереднена крива (рис. 6.9) має максимум для значення індексу сферичності 1.48. Слід зауважити, що більша частка отриманих нами індивідуальних кривих здорових дорослих донорів має максимум при цьому ж значенні індексу сферичності.

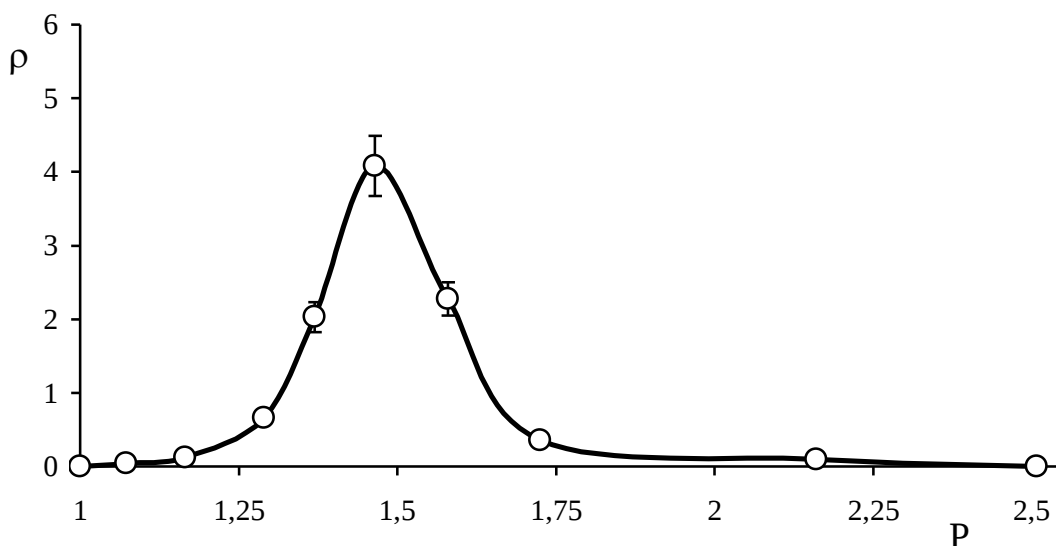


Рис. 6.9. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності (усереднена крива)

Максимальне значення відносного об'єму еритроцитів (V/V_0), котрого він досягає до початку гемолізу за даними різних авторів становить від 1,5 до 1,9. У роботі [234] шляхом безпосереднього візуального спостереження під мікроскопом визначено, що форма еритроцитів, яка відповідає максимальному об'єму при їх осмотичному гемолізі, є сферою з об'ємом, що

в 1.5-1.6 разів перевищує об'єм дискоцита в ізотонічному середовищі. Той факт, що різні автори вказують цілий спектр значень максимального об'єму, можна пояснити розкидом індексу сферичності в популяції еритроцитів. Наведені тут величини максимального об'єму відповідають саме значенням індексів сферичності еритроцитів у вихідному стані (до набрякання в гіпотонічному розчині). Але, щоб отримати дійсно середню величину цього параметра, треба виміряти його для великої кількості клітин, що методом спостереження під мікроскопом практично неможливо. Розроблений нами метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності дає можливість отримати не тільки середнє значення індексу сферичності, але й увесь спектр цього параметра в популяції еритроцитів.

Як уже відзначалось, розподіл еритроцитів за різними характеристиками суттєво змінюється в онтогенезі людини. Це визначається як зміною механізмів кровотворення, так і зміною умов функціонування організму в процесі розвитку від ембріона до плода, а також в постнатальному періоді [17]. Нами було досліджено розподіл еритроцитів за індексом сферичності в пуповинній крові людини. Результати показали, що запропонована характеристика виявляє значну неоднорідність цих популяцій. Індивідуальні криві розподілу еритроцитів пуповинної крові за індексом сферичності мають, як правило, полімодальний характер і є сумою нормальних розподілів кількох субпопуляцій (рис.6.10-6.17). Крім максимуму для клітин з індексом сферичності 1.37 ± 0.075 , який є найбільш наближеним до максимуму на кривих дорослих донорів, спостерігаються максимуми для клітин з індексами сферичності 1.2 ± 0.09 , 1.725 ± 0.08 . На деяких кривих має місце максимум для клітин з індексом сферичності 1.9 ± 0.03 . Значну питому вагу мають еритроцити, близькі до сферичних (з індексом сферичності 1.05-1.25): від 11.5% до 18%, порівняно з 4% в середньому для здорових дорослих донорів (рис. 6.9). В той же час відсоток сплюснених клітин з індексом сферичності в діапазоні 1.6-2.3 (~14%) також значно перевищує такий для здорових дорослих донорів (~8%).

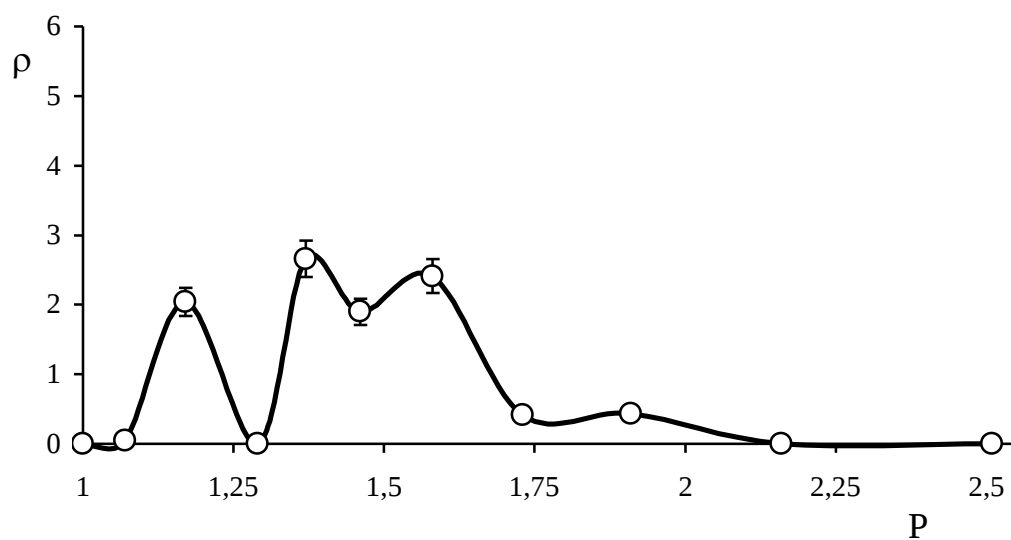


Рис. 6.10. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції пуповинної крові 1u

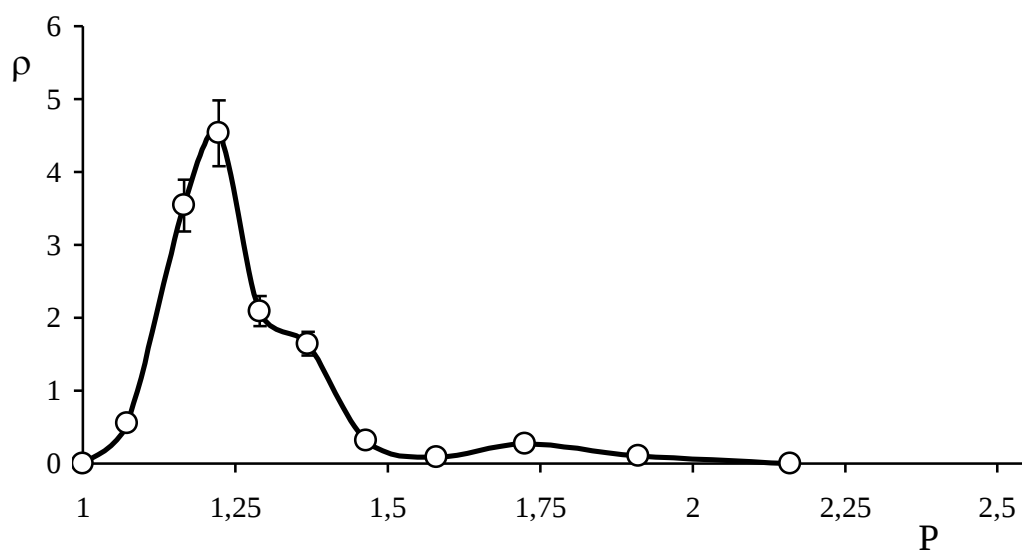


Рис. 6.11. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції пуповинної крові 2u

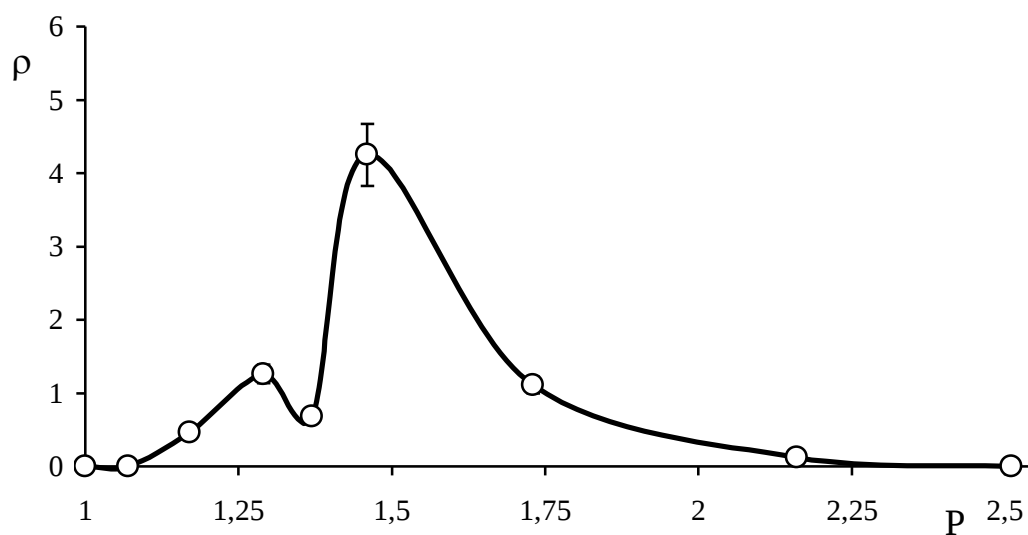


Рис. 6.12. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції пуповинної крові 3u

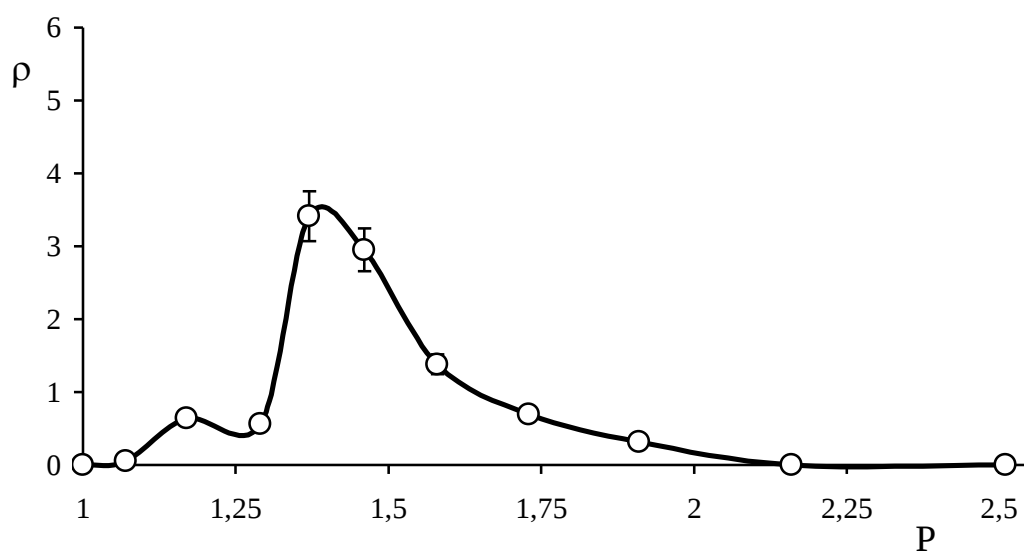


Рис. 6.13. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції пуповинної крові 4u

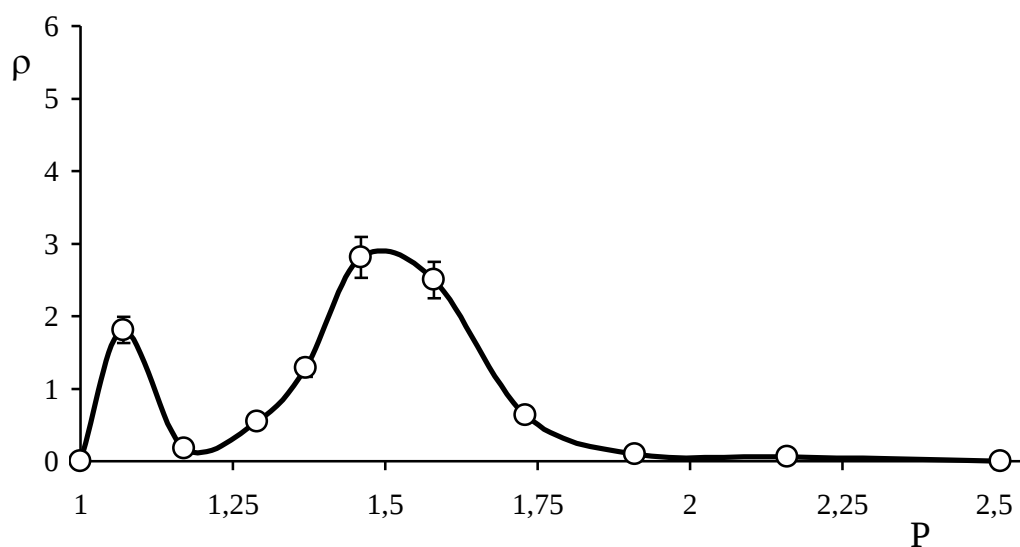


Рис. 6.14. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції пуповинної крові 5u

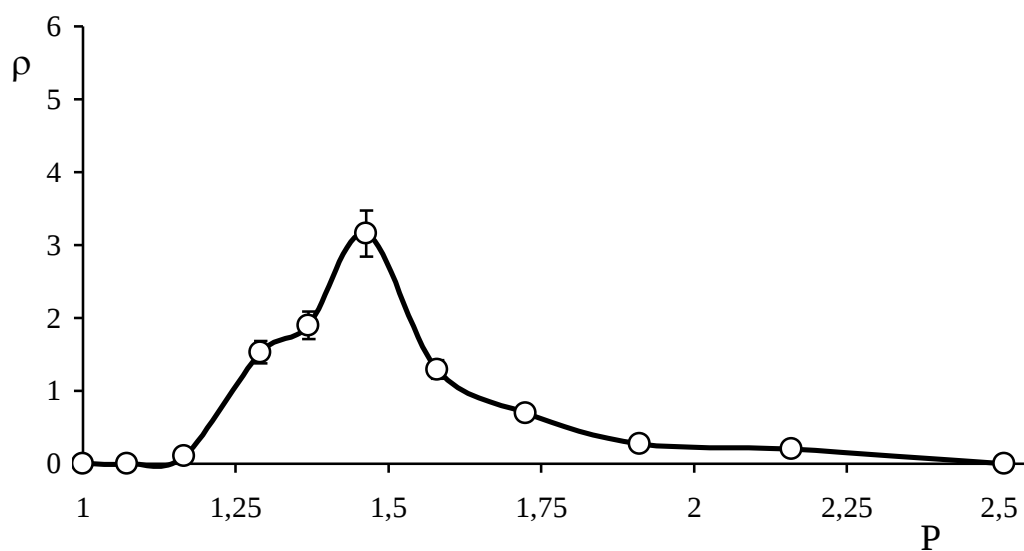


Рис. 6.15. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції пуповинної крові 7u

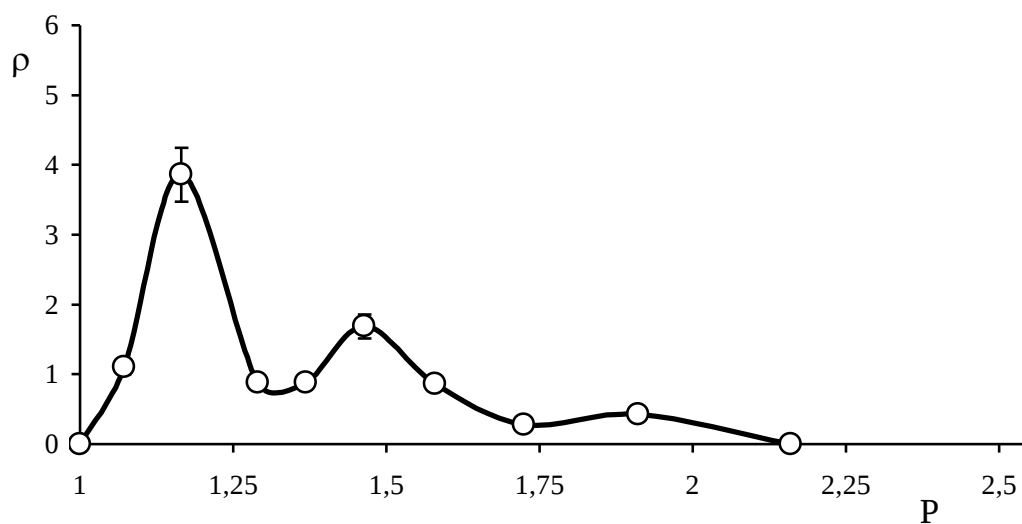


Рис. 6.16. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції пуповинної крові 8u

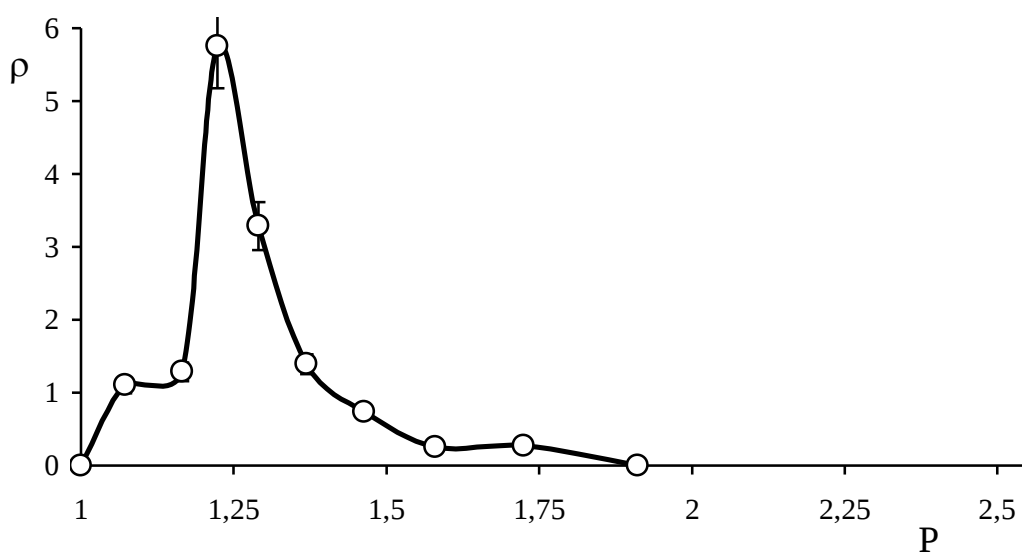


Рис. 6.17. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції пуповинної крові 9u

Такий широкий розкид параметрів наочно відображає усереднена по 10 донорах крива (рис.6.18). Одержані результати деякою мірою збігаються з даними кислотних еритрограм [224], які є ширшими у часовому діапазоні, ніж у дорослих донорів, що свідчить про неоднорідність популяції. Автори також відзначають підвищену кількість сферифікованих еритроцитів, але вказаний ними відсоток (~6%) є значно меншим, ніж виявлений нашим методом.

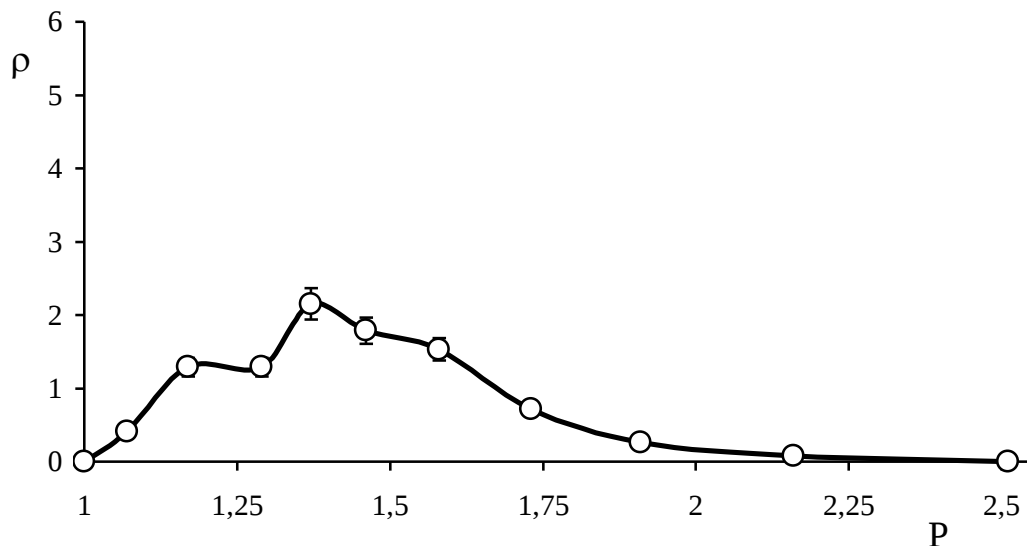


Рис. 6.18. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в пуповинній крові (усереднена крива)

Оскільки метод кислотних еритрограм не є безпосереднім показником форми еритроцитів, ми вважаємо, що отримані нами величини об'єктивніше відображають дану характеристику. На відміну від полімодального характеру розподілу еритроцитів новонароджених за індексом сферичності, кислотні еритрограми залишаються одномодальними. Це може бути пов'язаним з тим, що кислотна резистентність визначається низкою різних непрозорих чинників, тоді як розподіл клітин за індексом сферичності характеризує еритроцитарну популяцію за чітко визначеним кількісним параметром.

Таким чином, проведені дослідження показали, що розроблений метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності є

чутливим, інформативним тестом для кількісної оцінки стану популяції еритроцитів. Крім того, ця характеристика має ясний фізичний та фізіологічний сенс, оскільки форма еритроцита безпосередньо пов'язана з його віком та впливає на спроможність проходити крізь мікрокапіляри в циркуляційному руслі. Вона є також важливою для підбору зразків крові для подальшого кріоконсервування, оскільки очевидно, що кров, яка має підвищену кількість клітин, близьких до сферичних, буде гірше переносити осмотичні навантаження, що мають місце при низькотемпературному консервуванні.

6.3. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяціях еритроцитів хворих на гіпо- та гіпертиреоз

Різні гормони, що утворюються в організмі людини мають різний спектр дії. Одні з них специфічно регулюють лише функції певних органів - "мішеней". Дія інших гормонів спрямована на регуляцію певних сторін обміну речовин. На тлі такої метаболічної диференційованості вирізняється поліморфна дія тиреоїдних гормонів, які транслують свій ефект на численні метаболічні ланки майже на всіх структурних рівнях: на функції всіх клітин та субклітинних структур, на активність низки найважливіших ензимів. Під їх контролем знаходяться найважливіші біохімічні реакції білкового, вуглеводного, ліпідного та водно-сольового обмінів [235].

Вплив тиреоїдних гормонів в організмі здійснюється як геномним шляхом (через синтез різних речовин), так і негеномним (безпосередньо дією на процеси функціонування клітин) [236]. Порушується, зокрема, синтез жирних кислот. При гіпотиреозі вміст арахідонатів (4 ненасичені подвійні зв'язки) у фосфоліпідах знижується удвічі на тлі підвищення вмісту лінолеатів (2 ненасичені подвійні зв'язки). При цьому міцність зв'язку з білками значно зменшується [237]. Модуляція активності Na^+, K^+ -АТФази

також здійснюється шляхом впливу на її синтез [238, 239]. В той же час вважають, що активність Ca^{2+} -АТФази в еритроцитах контролюється тиреоїдними гормонами негеномним шляхом [236]. Активність Ca^{2+} -АТФази в еритроцитах зростає при гіпертиреозі і зменшується при гіпотиреозі [240]. Ще одна негеномна дія йодтиронинів полягає у впливі на цитоскелет через регуляцію розподілу в клітині дисульфідізомерази, що відіграє важливу роль у складанні новоутворених білків в ендоплазматичній мережі [237]. Описана також взаємодія T_3 з піруваткіназою в еритроцитах людини із зменшенням утворення АТФ у ході гліколізу і доступності пірувата для інших клітинних реакцій, наприклад циклу лимонної кислоти [242]. Таким чином, тиреоїдні гормони впливають на найрізноманітніші процеси в організмі і, зокрема, на клітинному і мембранному рівнях, можуть змінювати проникність та механічні властивості клітин, здатність підтримувати клітинний гомеостаз [243].

В нашому дослідженні була зроблена спроба оцінити стан популяції еритроцитів при гіпер- та гіпотиреозі шляхом визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності. Виявлено, що характерною рисою розподілу еритроцитів за індексом сферичності для груп хворих з ендокринною патологією був бі- та тримодальний вигляд кривих, як при гіпер-, так і при гіпотиреозі. Окрім головного максимуму, на кривих формуються один або два додаткові максимуми з меншим індексом сферичності, характерним для більш старих клітин, і більшим, який відповідає більш сплюсненим клітинам. У випадку гіпертиреозу серед клітин з нестандартним індексом сферичності більшу питому вагу (біля 25%) мали клітини з меншим індексом сферичності в діапазоні 1,07-1,22, і тільки 10% клітин мали індекс сферичності в діапазоні 1,73-1,9 (рис.6.19) (усереднена по 8 донорах крива). Це добре видно на індивідуальних кривих розподілу (рис.6.20-6.27). Інколи у хворих на гіпертиреоз крива мала трьохмодальний вигляд (рис.6.24) із значною кількістю сплюснених клітин. Це може бути пов'язаним з накладанням інших чинників. Наприклад, в даному

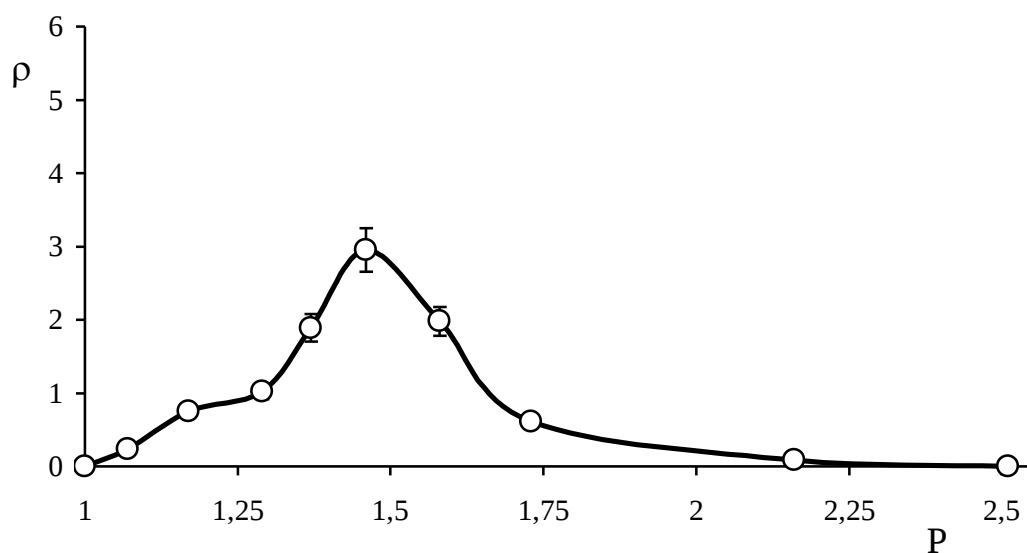


Рис. 6.19. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності при гіпертиреозі (усереднена крива)

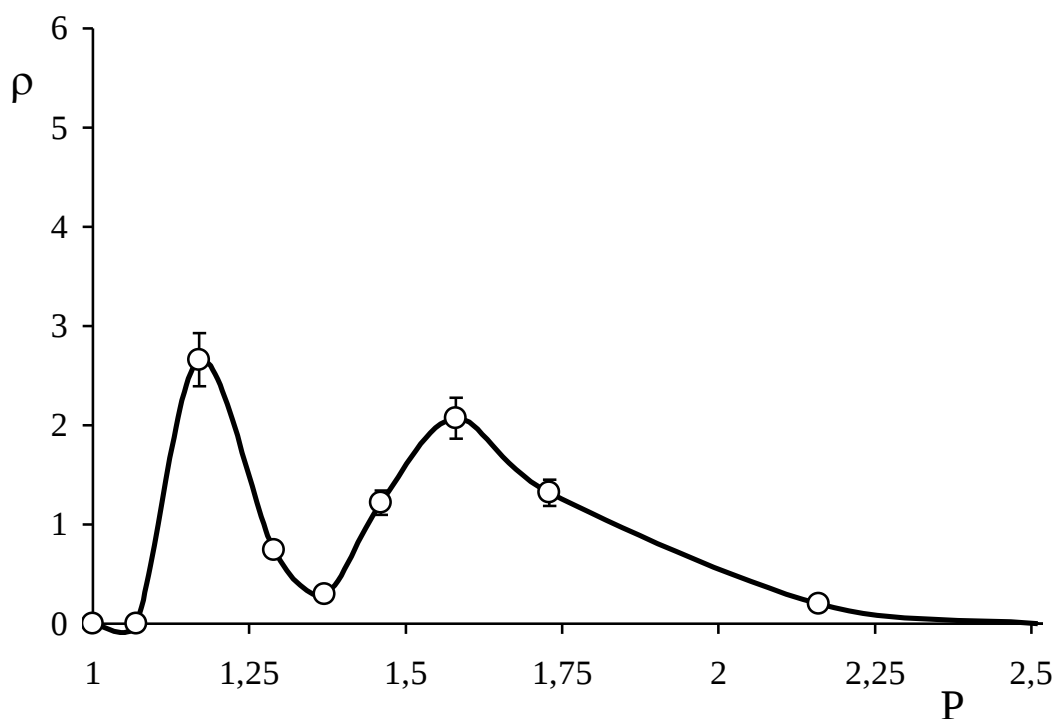


Рис. 6.20. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпертиреоз (донор 24d)

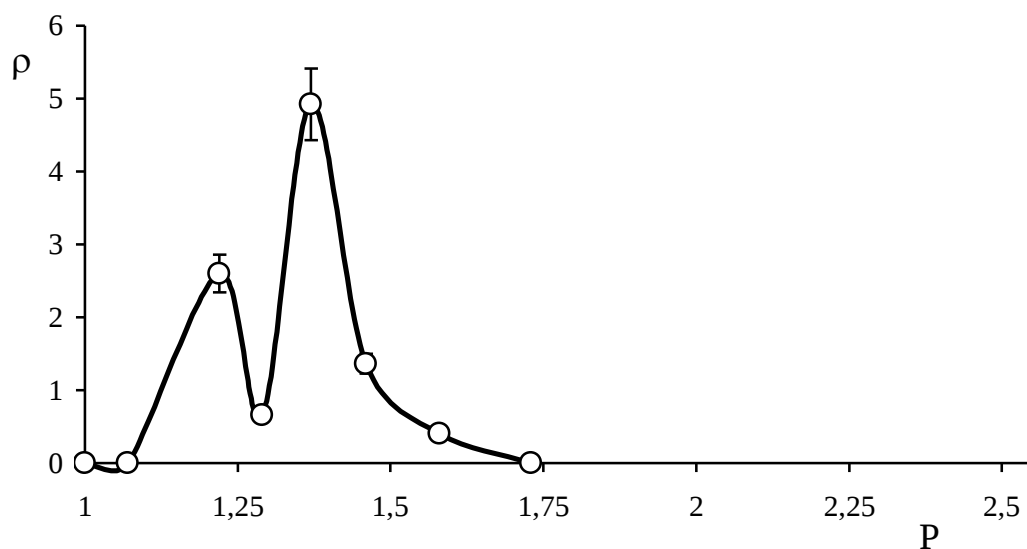


Рис. 6.21. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпертиреоз (донор 26d)

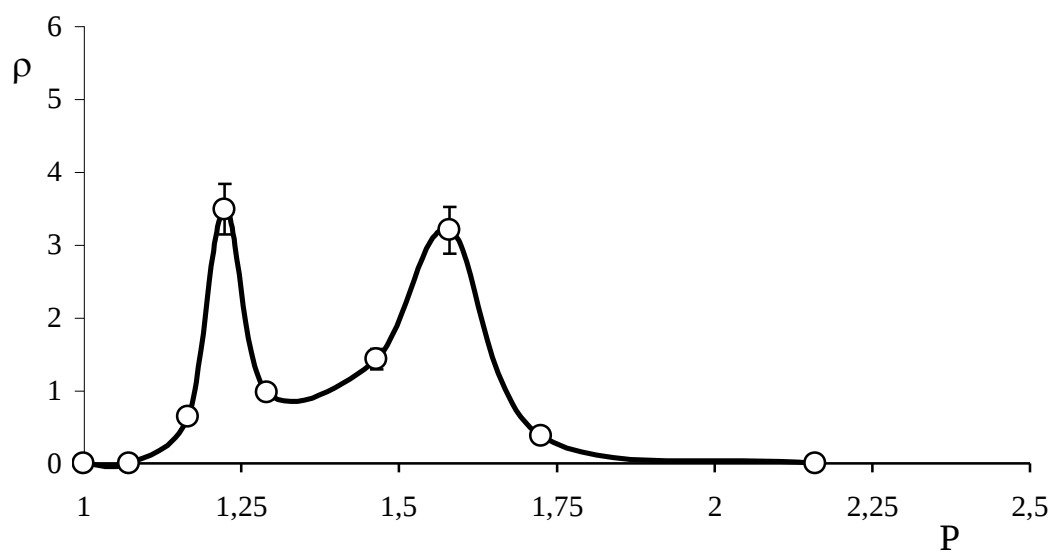


Рис. 6.22. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпертиреоз (донор 27d)

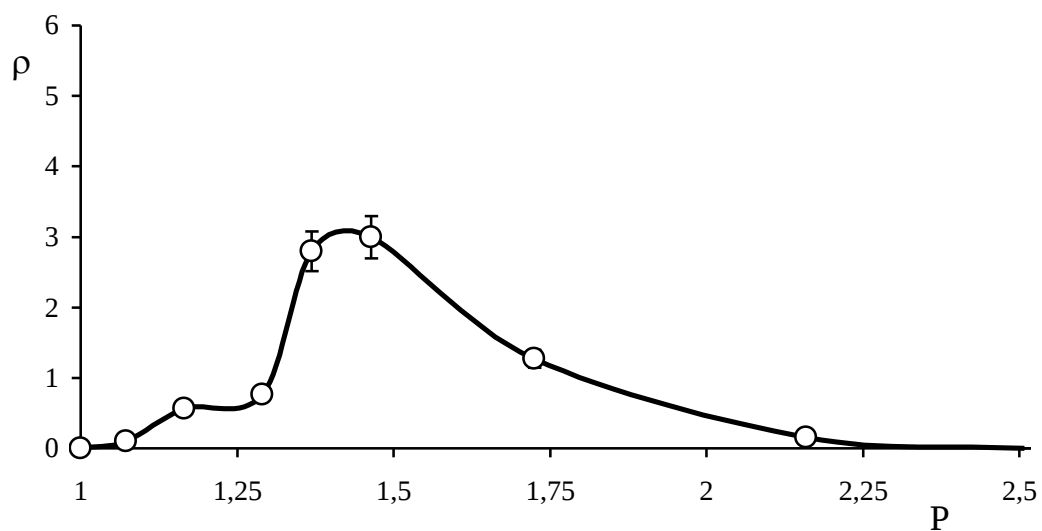


Рис. 6.23. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпертиреоз (донор 32d)

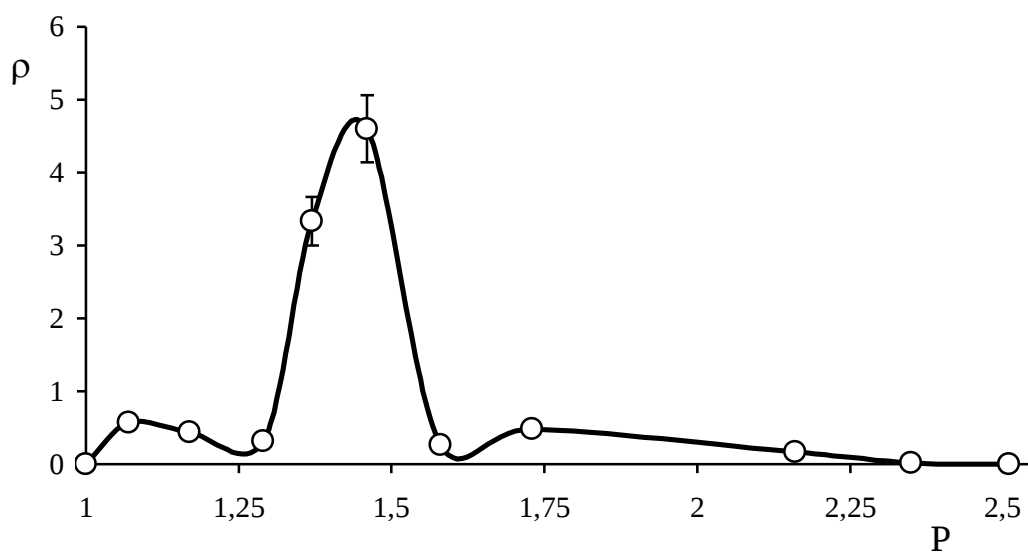


Рис. 6.24. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпертиреоз (донор 41d)

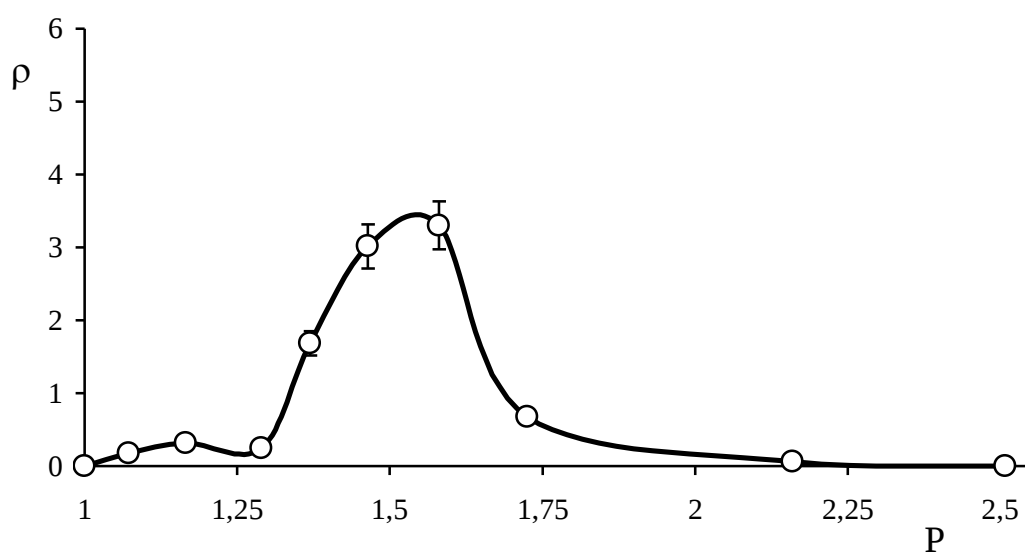


Рис. 6.25. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпертиреоз (донор 48d)

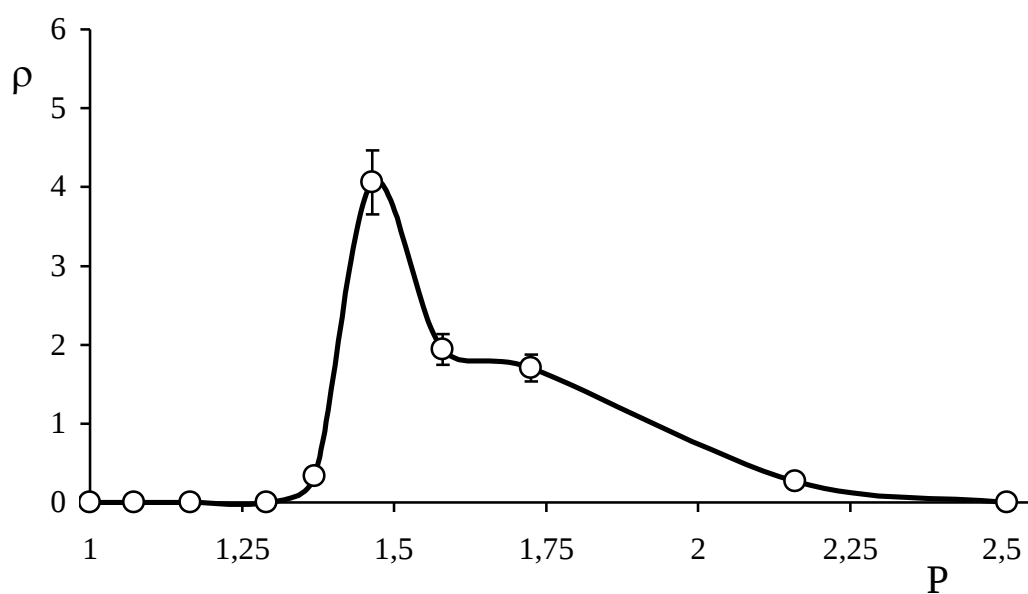


Рис. 6.26. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпертиреоз (донор 50d)

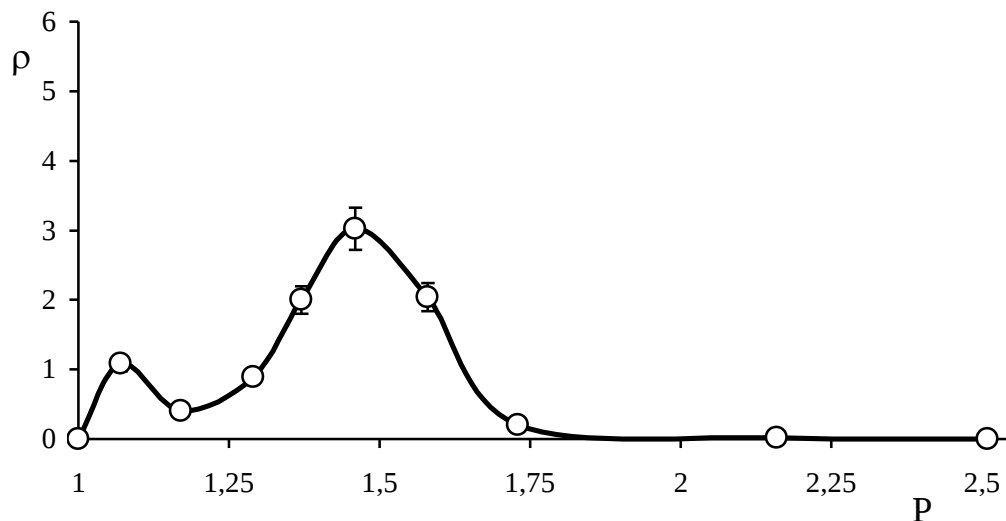


Рис. 6.27. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпертиреоз (донор 52d)

конкретному випадку хворий крім тиреотоксикозу мав також діабет. Збільшення кількості клітин, близьких до сферичних, при гіпертиреозі може бути пов'язаним, наприклад з пригніченням утворення АТФ в процесі гліколізу [242].

У випадку гіпотиреозу криві частіше мали трьохмодальний вигляд (рис.6.28-6.33) з більшою питомою вагою (біля 30%) сплюснених клітин в діапазоні індексів сферичності 1,65-2,46, ніж близьких до сферичних (біля 3%) в діапазоні 1,015-1,3 (рис.6.34). До того ж індекс сферичності сплюснених клітин значно перевищує індекс сферичності молодих дискоїдних клітин в контрольних зразках (рис.6.9), в яких дуже незначний відсоток клітин перевищував значення 1,9. Особливо наочно розкладання кривої на три розподіли з великою питомою вагою сплюснених клітин видно на рис. 6.31. В даному випадку хворий крім гіпотиреозу страждав також гіпаратиреозом.

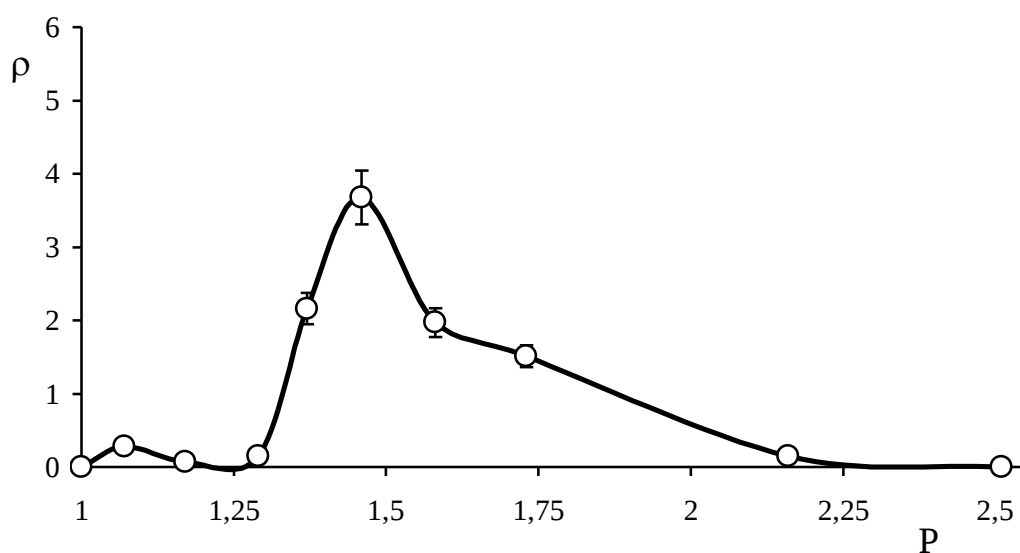


Рис. 6.28. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпотиреоз (донор 25d)

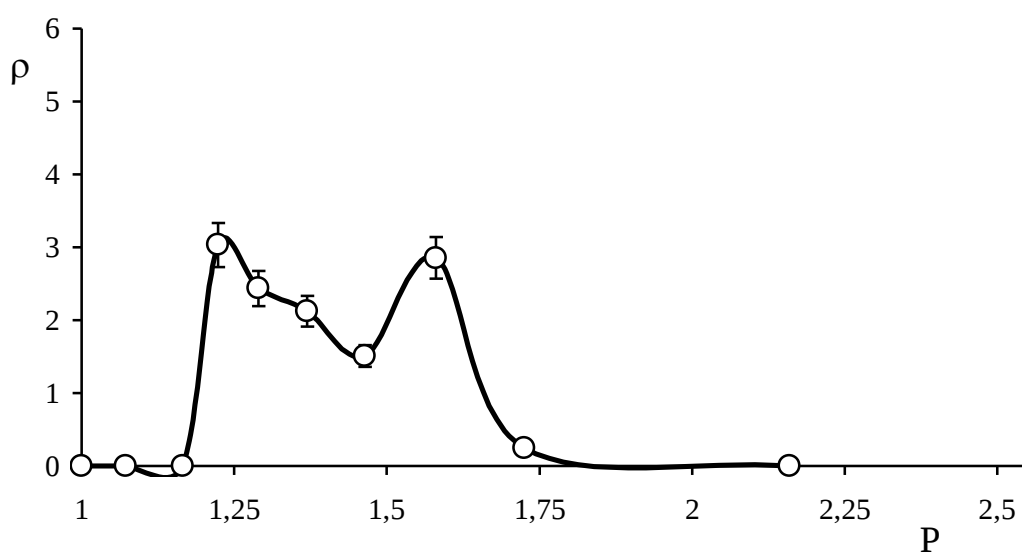


Рис. 6.29. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпотиреоз (донор 28d)

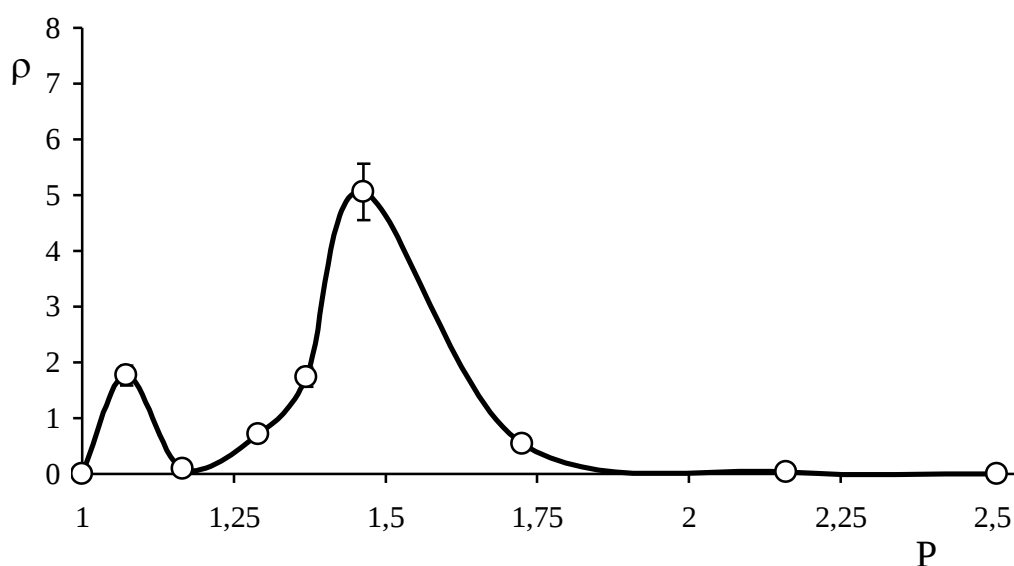


Рис. 6.30. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпотиреоз (донор 35d)

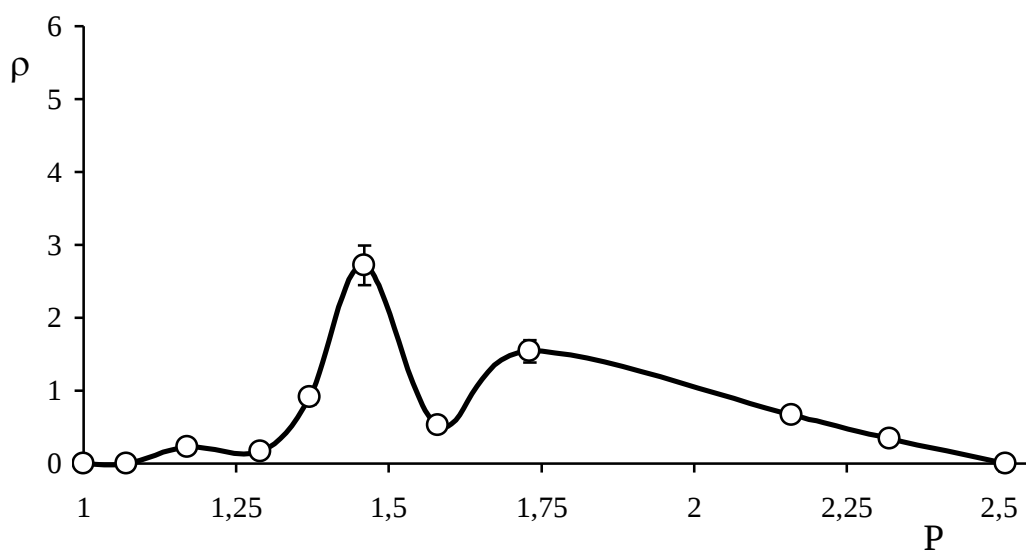


Рис. 6.31. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпотиреоз (донор 42d)

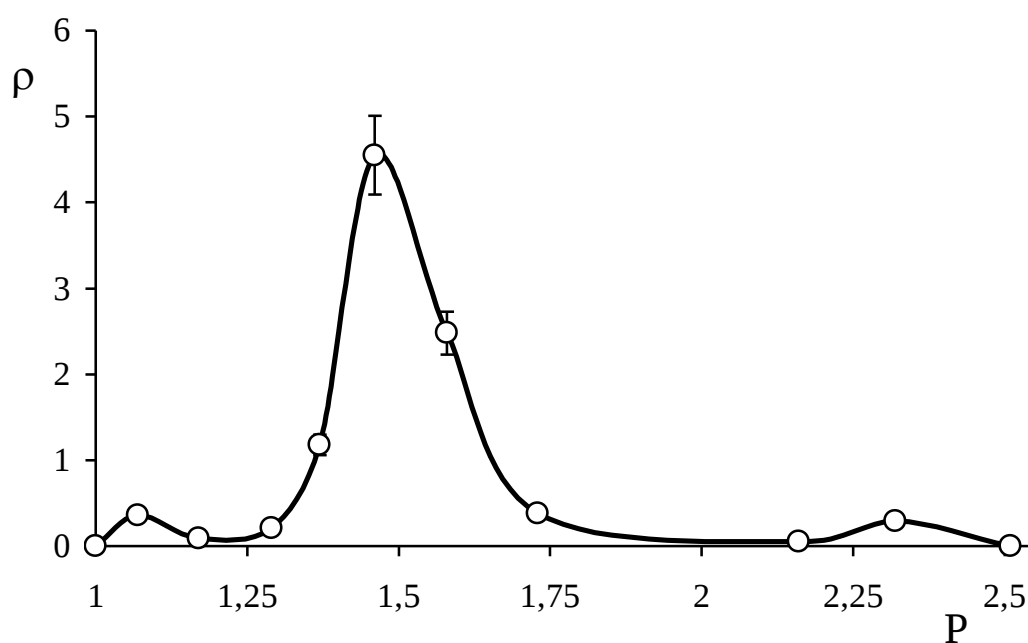


Рис. 6.32. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпотиреоз (донор 43d)

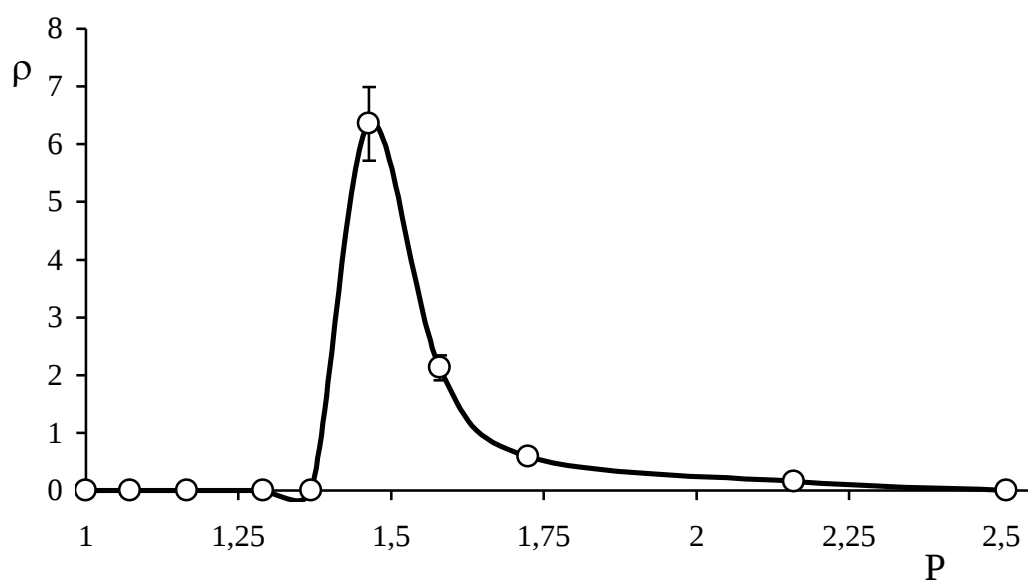


Рис. 6.33. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворого на гіпотиреоз (донор 51d)

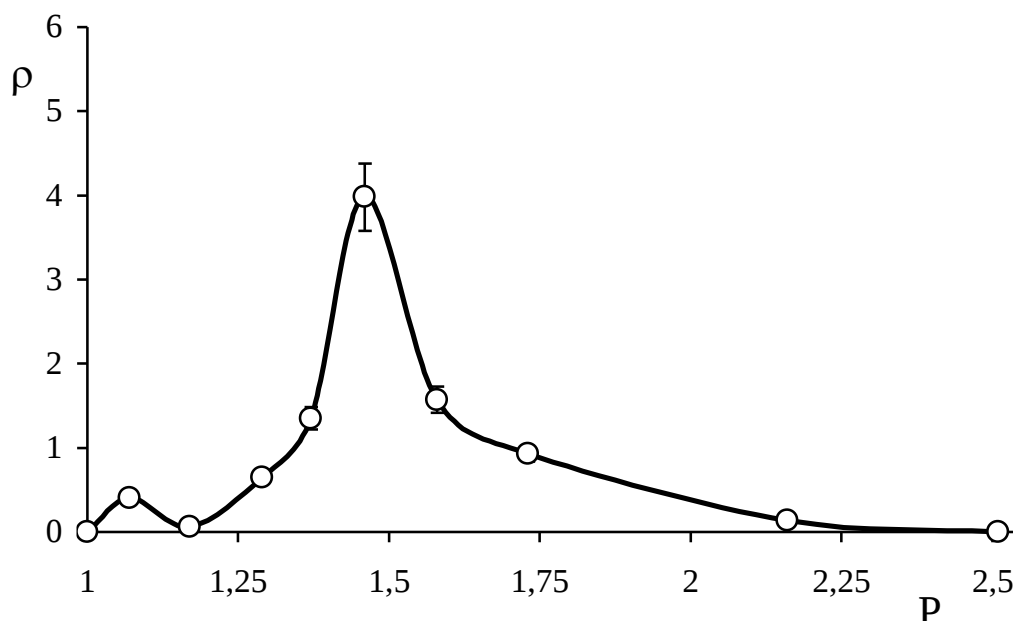


Рис. 6.34. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності при гіпотиреозі (усереднена крива)

Звертаючись до даних літератури, можна припустити, що однією з можливих причин цього може бути вплив тиреоїдних гормонів на Ca^{2+} -АТФазу в еритроцитах, активність якої зменшується при гіпотиреозі [235]. Одним з аргументів на користь можливої ролі порушення кальцієвого обміну у виявлених ефектах є той факт, що найбільшу питому вагу надмірно сплюснених клітин мала еритроцитарна популяція хворого на гіпотиреоз та гіпопаратиреоз, оскільки відомо, що недостатність функції паращитоподібної залози призводить до серйозних пошкоджень кальцієвого обміну. Кальцій є універсальним тригером багатьох клітинних реакцій внаслідок особливостей транспорту і розподілу кальцію всередині клітин. Короткочасний зріст концентрації вільного кальцію в цитоплазмі під впливом певних чинників за рахунок вивільнення із внутрішньоклітинних депо є сигналом для запуску специфічних реакцій, наприклад, транспортних систем, активності низки ферментів [244]. Порушення кальцієвого обміну при гіпотиреозі, а особливо при гіпопаратиреозі, може викликати серйозні збої подібних механізмів регуляції в клітинах.

В цілому, беручи до уваги генералізований характер впливу тиреоїдних гормонів на організменому, клітинному та мембранному рівнях, важко відокремити певні строго визначені причини отриманих ефектів. Але можна стверджувати, що розроблений метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності є чутливим, добре відтворюваним тестом для кількісної оцінки стану популяції еритроцитів того чи іншого донора при різних патологіях.

6.4. Вплив температури на розподіл еритроцитів за індексом сферичності

Давно відомо, що температура є важливим чинником, що впливає на осмотичну крихкість еритроцитів, підвищуючи їх резистентність до гемолізу. Еритроцити є більш стабільними при більш високій температурі аж до 49-50°C [245,246]. Запропоновано багато пояснень цього явища:

(1) Ізотонічний об'єм клітини є температурозалежним, збільшення температури викликає зменшення об'єму при постійній площі поверхні. Це приводить до збільшення поверхнево-об'ємного відношення при зміні температури, отже, зменшує осмотичну крихкість. Але експериментальні дослідження не підтвердили такого ефекту. Вимірювання мікрогематокриту [247], мікропіпеткові вимірювання [248] не виявили зміни ізотонічного об'єму з температурою;

(2) При збільшенні температури збільшується виключно площа поверхні клітин (а, отже, і поверхнево-об'ємне відношення) [247,248]. Внаслідок цього за високих температур необхідна більш значна зміна об'єму і, отже, більше зменшення осмотичності позаклітинного середовища для того, щоб викликати набрякання клітин до сферичного об'єму. В ранніх роботах не було виявлено залежності гемолітичного об'єму від температури.

Але в роботах [185,248] було показано існування температурної залежності площі поверхні еритроцитів на підставі прямих вимірювань з використанням мікропіпеткового методу. Автори зробили висновок, що площа поверхні еритроцита збільшується з температурним коефіцієнтом $1,2 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$, тобто на 4,8% від 0 до 40°C ;

(3) Третє пояснення базується на припущенні температурної залежності витоку калію (що супроводжується втратою води), яке має місце при досягненні клітинами критичного об'єму [249], що могло б пояснити зниження осмотичної крихкості при підвищенні температури. Але така температурна залежність експериментально не була доведена [245];

(4) Четверте пояснення так само пов'язано з властивостями мембрани і зв'язує зменшення осмотичної крихкості зі збільшенням механічного опору мембран еритроцитів, (тобто збільшенням модуля ізотропного розтягу) при збільшенні температури, внаслідок чого клітина гемолізує при більшому об'ємі. Автори робіт [250,251] також пов'язують ефект температури на осмотичну крихкість з безпосередньою дією температури на критичний об'єм сфероцита. Але експериментально це не було підтверджено достовірними вимірюваннями гемолітичного об'єму. До того ж, як ми вже зазначали в підрозділі 6.1, навіть невеликий ізотропний розтяг мембрани еритроцитів приводить до його гемолізу при спливанні достатньо великого проміжку часу. Це пов'язано з флуктуаційним утворенням пори в розтягнутій мембрані. Тому величина модуля ізотропного натягу не буде впливати на кінцеву кількість клітин, що зазнають гемолізу, а буде залежати тільки від індексу сферичності;

(5) П'яте пояснення пов'язує зміну осмотичної крихкості еритроцитів з температурою із змінами в цитоплазмі, наприклад, внаслідок зміни осмотичної активності гемоглобіну. Але припущення, що осмотична відповідь клітини є температурозалежною, не було підтверджено експериментально [251]. Було показано, що нахил залежності об'єму еритроцитів від осмотичності середовища є однаковим як при 0, так і при

40°C. Автори роботи [244] також показали, що еритроцити, які містили різну кількість гемоглобіну, демонструють однакову температурну залежність осмотичної крихкості. Автори зробили висновок, що температура скоріше впливає на мембрану клітин, ніж на цитоплазматичні компоненти.

Враховуючи все вищевикладене, можна зробити висновок, що, оскільки внутрішньоклітинний розчин є практично нестисливим, збільшення осмотичної резистентності при підвищенні температури пов'язано зі змінами в мембрані, а саме, зі збільшення індексу сферичності внаслідок збільшення площі поверхні мембрани.

У нашому дослідженні отримано кінетичні криві гемолізу еритроцитів крові трьох донорів в діапазоні концентрацій хлористого натрію від ізотонічного до таких, що викликали гемоліз всіх еритроцитів в популяції, в трьох температурних точках – 3, 20 та 37°C. Характерні кінетичні криві гемолізу подані на рис. 6.35 (a,b,c). З представлених кривих ясно видно, що швидкість гемолізу значно зменшується з температурою. Тому дуже важливо визначати відсоток збережених клітин, коли процес гемолізу закінчився. Застосований метод малокутового розсіювання світла, який дає можливість слідкувати за кінетикою гемолізу, забезпечує більш точне визначення досліджуваного параметра. Крім того, залежність експериментальних кривих гемолізу від температури узгоджуються із теоретичними уявленнями про процес гемолізу внаслідок флуктуаційного утворення пори, який залежить від температури. Оскільки проникність мембран еритроцитів для води навіть при 0°C є дуже великою (десятки мілісекунд), неможливо б було пояснити залежність швидкості гемолізу від температури зміною швидкості проникання води в еритроцити.

З отриманих залежностей відсотку збережених клітин від осмотичного тиску позаклітинного розчину розраховували щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяціях окремих донорів. Розраховані криві розподілу представлені на рис. 6.36–6.38.

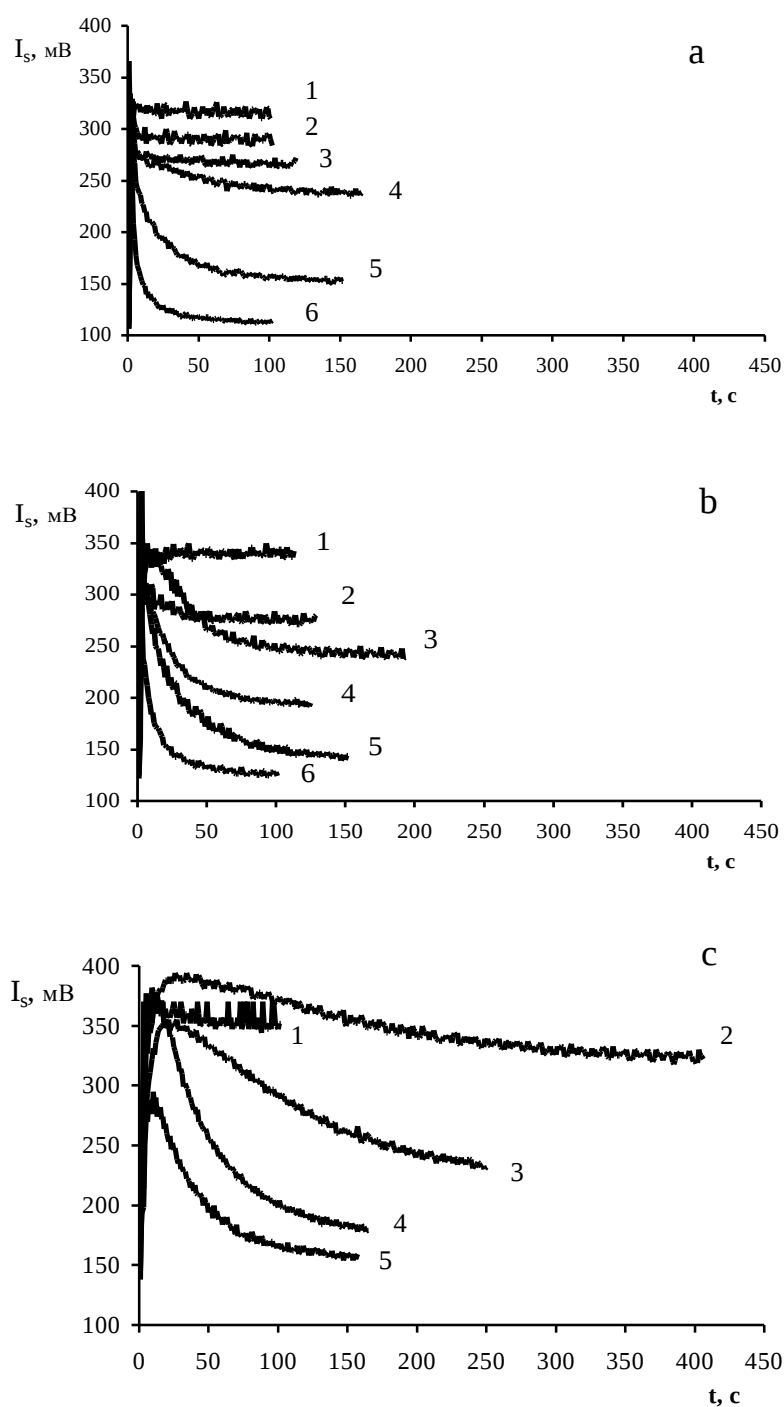


Рис. 6.35. Кінетичні криві гемолізу еритроцитів донорської крові (35d) в розчинах хлориду натрію (1 - 0,9%; 2 - 0,7%; 3 - 0,6%; 4 - 0,55%, 5 - 0,5%; 6 - 0,4%) при температурах 37°C (a), 20°C (b) і 3°C (c)

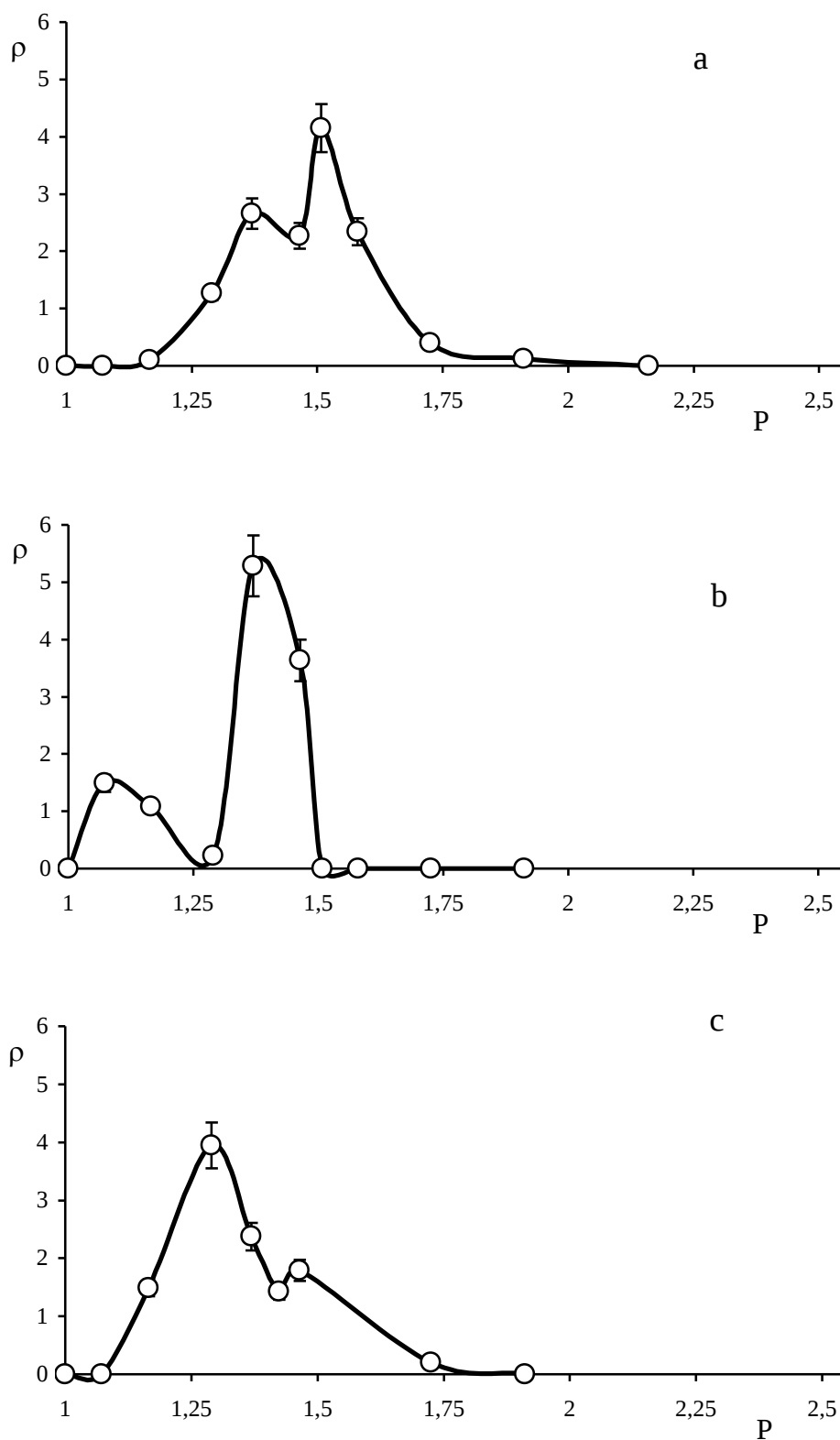


Рис. 6.36. Розподіл еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 34d при температурах 37°C (a), 20°C(b) і 3°C (c)

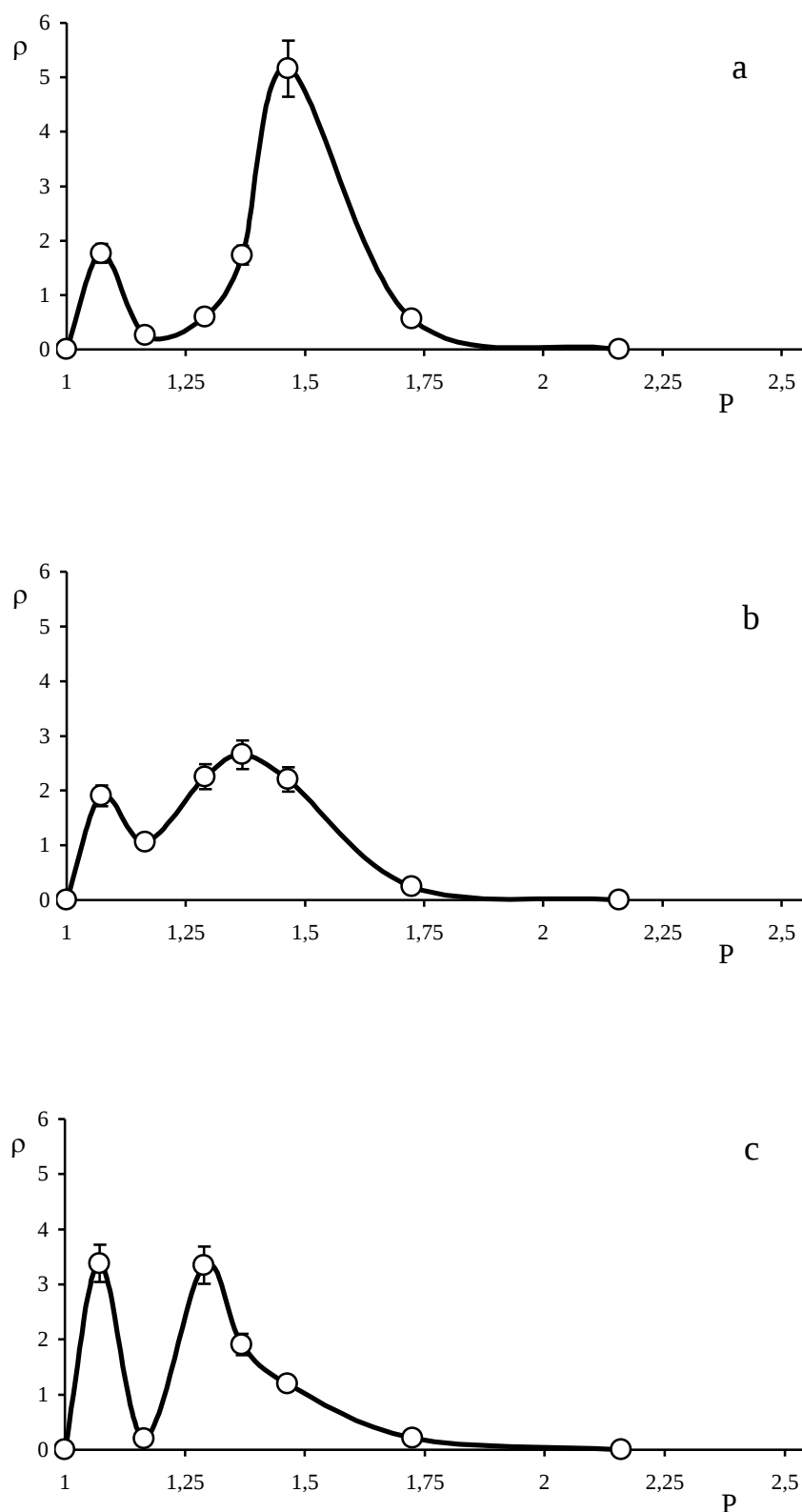


Рис. 6.37. Розподіл еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 35d при температурах 37°C (a), 20°C (b) і 3°C (c)

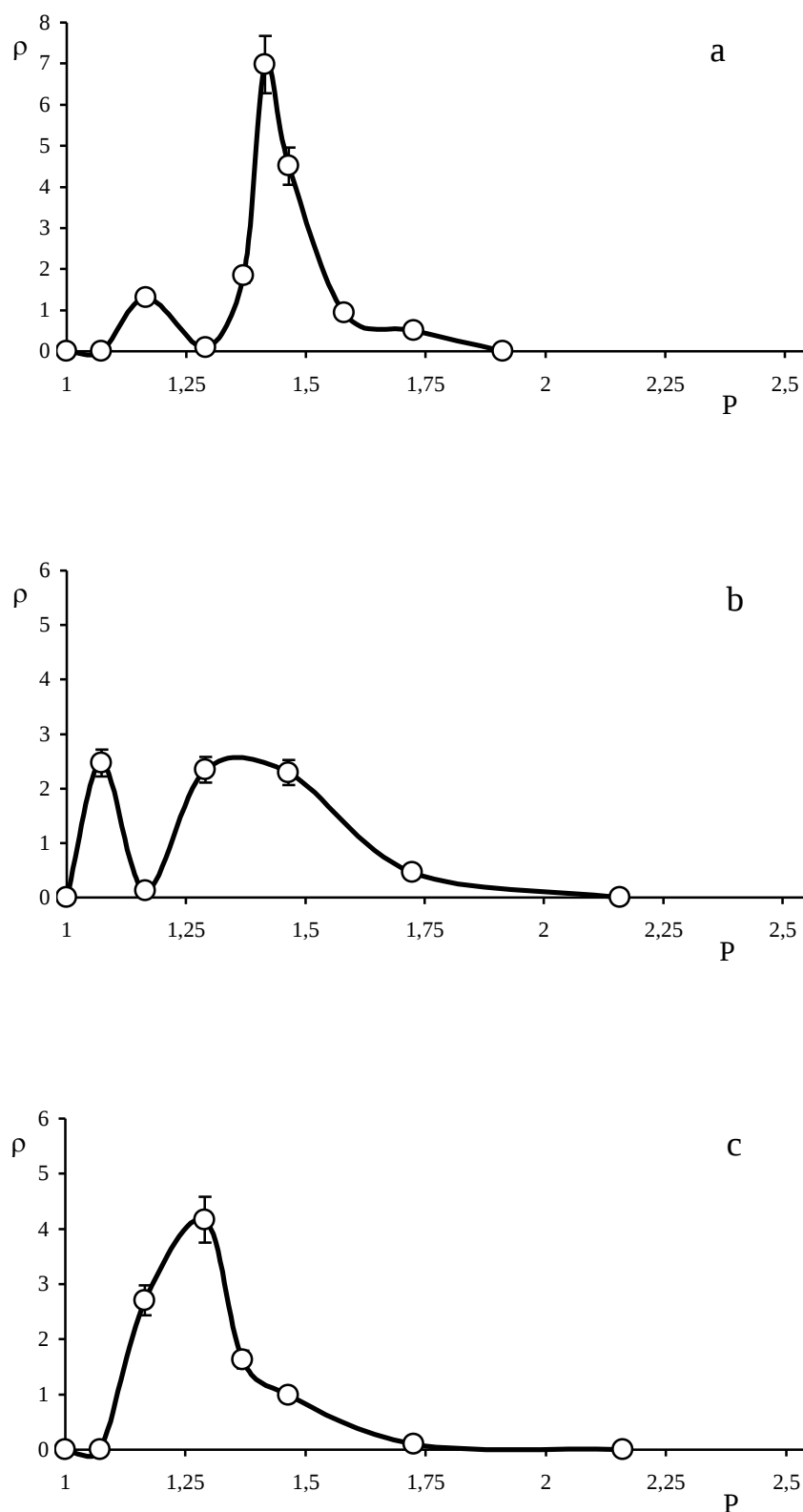


Рис. 6.38. Розподіл еритроцитів за індексом сферичності в популяції донора 36d при температурах 37°C (a), 20°C (b) і 3°C (c)

Усереднені по трьох донорах криві представлені на рис.6.39.

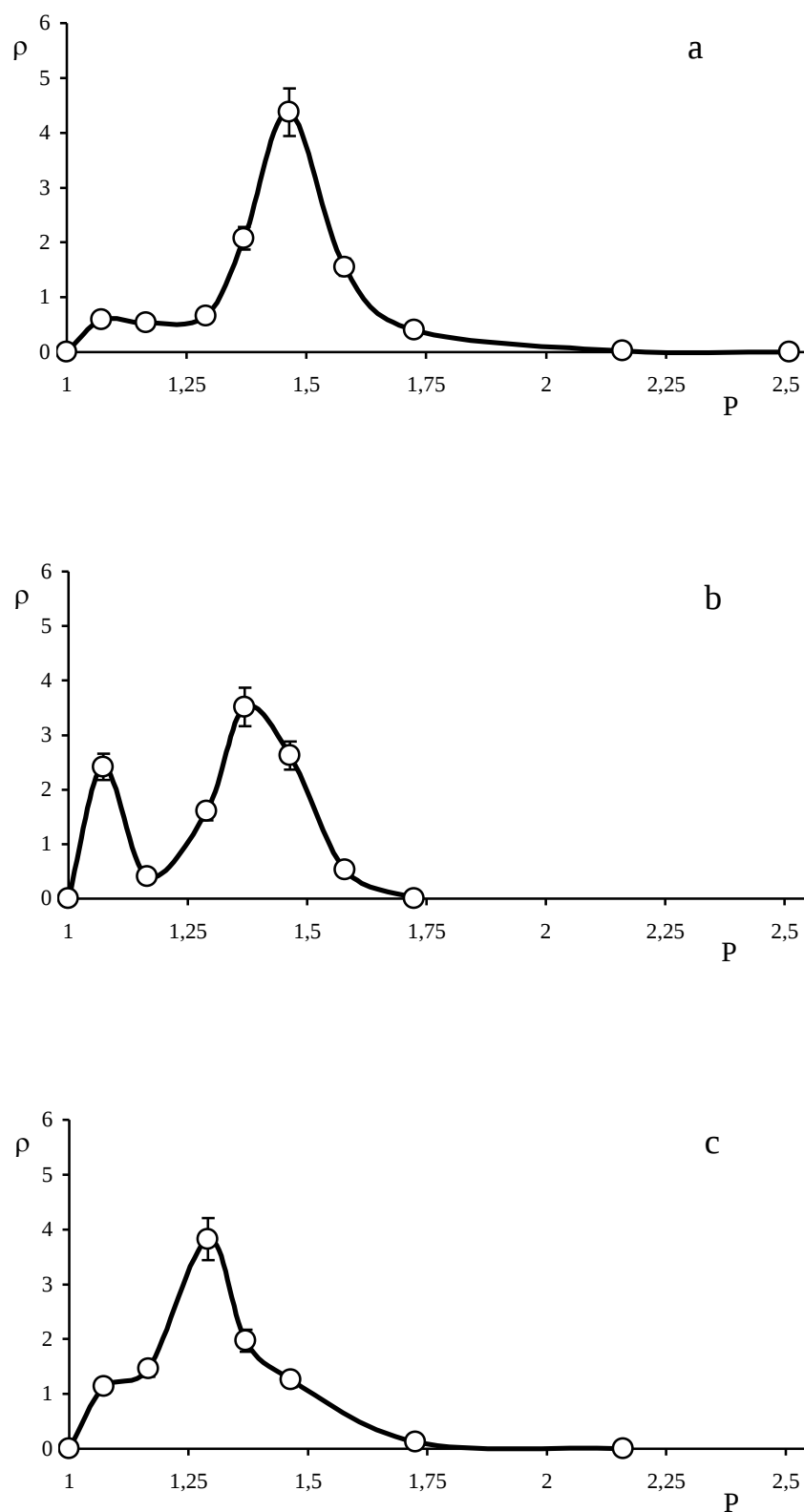


Рис. 6.39. Розподіл еритроцитів донорської крові за індексом сферичності при температурах 37°C (a), 20°C (b) і 3°C (c) (усереднені криві)

Розташування та зсув центру головного максимуму розподілів подано в табл. 6.1., відсоток клітин, близьких до сферичних ($P=1,0\div 1,3$) наведено в табл. 6.2.

Таблиця 6.1

Вплив температури на розташування та зсув максимуму щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності

Донор	$P_{\max}$			ΔP	
	37°C	20°C	3°C	37→20°C	37→3°C
34	1,48	1,38	1,25	-0,1	-0,23
35	1,52	1,37	1,3	-0,15	-0,22
36	1,45	1,35	1,3	-0,1	-0,15
Усереднена крива	1,48	1,38	1,3	-0,1	-0,18

Таблиця 6.2

Вплив температури на кількість клітин, близьких до сферичних ($P=1,0\div 1,3$)

Донор	Відсоток клітин з індексом сферичності $1,0\div 1,3$		
	37°C	20°C	3°C
34	16,7	55,5	60
35	7,2	33,3	38
36	15,0	39,0	58,2
Усереднена крива	15,5	36,6	52

З наведених даних, представлених на рисунках та в таблицях видно, що зниження температури від 37 до 3°C приводить до зсуву максимумів розподілів в область менших індексів сферичності і значного збільшення кількості клітин, що мають низький індекс сферичності, тобто більш наближених до сферичних. Цей результат цілком узгоджується з існуючими

наразі уявленнями щодо впливу температури на геометричні параметри еритроцитів та їх осмотичну крихкість.

З отриманих експериментальних даних можна оцінити величину коефіцієнту теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів в інтервалі температур від 3 до 37°C. З визначення індексу сферичності (6.7) випливає, що

$$\Delta P = \frac{1}{6\sqrt{\pi}V_0} \left[S_0^{3/2} - (S_0 + \Delta S)^{3/2} \right] \quad (6.19)$$

Враховуючи, що

$$\Delta S = kS_0\Delta T \quad (6.20)$$

де k - коефіцієнт теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцита, отримуємо

$$k = \frac{1}{\Delta T} \left[\left(1 - \frac{\Delta P}{P_0} \right)^{2/3} - 1 \right] \quad (6.21)$$

Підставляючи у співвідношення (6.21) одержані експериментальні дані для усередненої кривої, тобто $P_0=1.48$, $\Delta P=0,18$ для інтервалу температур від 3 до 37°C (тобто для $\Delta T=34$), отримуємо значення коефіцієнту теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцита $k=2,4 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$. Ця величина є в два рази більшою від виміряної мікропіпетковим методом [185]. Але, враховуючи той факт, що кожний метод має свої особливості та труднощі, як експериментальні, так і теоретичні, ми вважаємо, що отримане узгодження з даними роботи [185] є цілком задовільним. На величину коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембрани можуть впливати як чинники, пов'язані з індивідуальними властивостями еритроцитів різних

донорів (наприклад ліпідний склад мембрани), так і розкид параметрів в популяції. Важливу роль можуть відігравати і зовнішні чинники, наприклад, умови зберігання еритроцитів до експерименту, або умови, в яких еритроцити знаходяться під час експерименту.

Отримані нами в підрозділі 6.1 співвідношення дозволяють також розрахувати час напівгемолізу еритроцитів в гіпотонічних розчинах непроникаючої речовини ($t_{1/2,m}$). Оскільки для отримання кривих осмотичної крихкості ми реєстрували кінетику гемолізу в серії гіпотонічних розчинів NaCl, маємо можливість порівняти теоретично розраховані значення $t_{1/2,T}$ з експериментальними значеннями цього параметру $t_{1/2,e}$. Експериментально визначені та розраховані за формулою (6.18) значення часу напівгемолізу $t_{1/2}$, теоретично розраховані гемолітичний об'єм (y_∞), ізотропний натяг мембрани (σ) та відносний об'єм. при досягненні якого гемолізує половина клітин в популяції ($y_{1/2}$) при $\gamma=10^{-11}\text{H}$, $\Gamma=0,42 \text{ Н/м}$ і при трьох досліджених температурах (37°C, 20°C, та 3°C) і різних значеннях осмотичного тиску позаклітинного розчину подані в табл. 6.3-6.5. При цьому значення

Таблиця 6.3

Теоретичні ($t_{1/2,m}$) та експериментальні ($t_{1/2,e}$) значення часу напівгемолізу (с), асимптотичного значення відносного об'єму клітин (y_∞), ізотропного натягу клітинних мембран (σ , Н/м) в залежності від осмотичного тиску позаклітинного розчину $\hat{\pi}^{out}$ для еритроцитів донорської крові людини при температурі 37°C.

$\hat{\pi}^{out}$	0,4[4]	0,5	0,5[5]	0,6[1]	0,6[6]	0,7[7]	0,8[8]
y_∞	1,8627	1,8204	1,7689	1,6837	1,4937	1,4056	1,3131
$\sigma \cdot 10^2$	9,633	8,953	8,4545	8,2657	8,9504	8,3246	7,9498
$y_{1/2}$	1,41	1,402	1,38	1,32	1,1505	1,1003	1,038
$t_{1/2,T}$	3,96	7,0	11,2	13,6	7,0	12,8	19,27
$t_{1/2,e}$	4,0	6,0	11,6	20,0	-	-	-

Таблиця 6.4

Теоретичні ($t_{1/2,m}$) та експериментальні ($t_{1/2,e}$) значення часу напівгемолізу (с), асимптотичного значення відносного об'єму клітин (y_∞), ізотропного натягу клітинних мембран (σ , Н/м) в залежності від осмотичного тиску позаклітинного розчину $\hat{\pi}^{out}$ для еритроцитів донорської крові людини при температурі 20°C.

$\hat{\pi}^{out}$	0,4[4]	0,5[5]	0,6[1]	0,6[6]	0,7[7]	0,8[8]
y_∞	1,7743	1,7	1,6177	1,5159	1,3493	1,3022
$\sigma \cdot 10^2$	10,3	8,929	8,7308	8,7693	8,8092	8,0398
$y_{1/2}$	1,32	1,31	1,253	1,173	1,043	1,027
$t_{1/2,m}$	8,05	28,8	35,78	34,31	32,83	83,37
$t_{1/2,e}$	7,5	21,25	-	35,0	-	-

Таблиця 6.5

Теоретичні ($t_{1/2,m}$) та експериментальні ($t_{1/2,e}$) значення часу напівгемолізу (с), асимптотичного значення відносного об'єму клітин (y_∞), ізотропного натягу клітинних мембран (σ , Н/м) в залежності від осмотичного тиску позаклітинного розчину $\hat{\pi}^{out}$ для еритроцитів донорської крові людини при температурі 3°C.

$\hat{\pi}^{out}$	0,4[4]	0,5[5]	0,6[1]	0,6[6]	0,7[7]	0,8[8]
y_∞	1,6848	1,6124	1,5734	1,5434	1,4349	1,3545
$\sigma \cdot 10^2$	11,13	9,6156	9,0735	8,554	8,0939	7,6237
$y_{1/2}$	1,229	1,221	1,208	1,201	1,13	1,08
$t_{1/2,m}$	7,8	28,02	49,23	90,56	165,0	329,1
$t_{1/2,e}$	7,5	23,5	-	90,0	-	-

передекспоненційного множника в рівнянні (6.18) вважалось постійним і рівним 0,00225, а параметр $\beta = (\pi\gamma^2/kT)(3y_s/4\Gamma)$ набував значення $\beta=2,64$ при 37°C, $\beta=2,67$ при 20°C та $\beta=2,7$ при 3°C.

Задовільне узгодження експериментальних та теоретичних значень часів напівгемолізу в низці гіпотонічних розчинів непроникаючої речовини в трьох точках температурного діапазону свідчить про адекватність розробленої фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу, на яку спирались наведені в табл.6.3-6.5 розрахунки.

6.5. Висновки

На підставі побудованої фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу в розчині непроникаючої речовини створено оригінальний і простий метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності. На відміну від відомих методів визначення геометричних параметрів еритроцитів розроблений метод дає можливість отримати не тільки середнє значення індексу сферичності, але й увесь спектр цього параметра в популяції еритроцитів.

Експериментально досліджено розподіл еритроцитів за індексом сферичності в популяціях дорослих донорів та в пуповинній крові людини. Дана характеристика варіює для різних донорів, відбиваючи таким чином стан популяції еритроцитів окремого донора. Більшість розподілів здорових дорослих донорів має вигляд близький до гаусового з максимумом при значенні індексу сферичності 1,48. Індивідуальні криві розподілу еритроцитів пуповинної крові за індексом сферичності, як правило, мають полімодальний характер і є сумою нормальних розподілів кількох субпопуляцій.

Характерною рисою розподілу еритроцитів за індексом сферичності для груп хворих з ендокринною патологією є бі- та тримодальний вигляд

кривих як при гіпер-, так і при гіпотиреозі. У випадку гіпертиреозу серед клітин з нестандартним індексом сферичності більшу питому вагу (біля 25%) мають клітини з меншим індексом сферичності в діапазоні 1,07-1,22. При гіпотиреозі криві частіше мають трьохмодальний вигляд з більшою питомою вагою (біля 30%) сплюснених клітин в діапазоні індексів сферичності 1,65-2.46, ніж близьких до сферичних (біля 3%).

Зниження температури від 37°C до 3°C приводить до зсуву максимумів розподілів в область менших індексів сферичності і до значного збільшення кількості клітин, що мають низький індекс сферичності, тобто більш наближених до сферичних. За одержаними експериментальними даними коефіцієнт теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів в інтервалі температур від 3 до 37°C. має значення $k=2,4 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$, яке цілком задовільно узгоджується з величиною, виміряною мікропіпетковим методом

Експериментально визначено та теоретично розраховано за побудованою фізико-математичною моделлю значення часу напівгемолізу в розчинах непроникаючої речовини. Задовільне узгодження експериментальних та теоретичних значень часів напівгемолізу в низці гіпотонічних розчинів непроникаючої речовини в трьох точках температурного діапазону свідчить про адекватність розробленої фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу, на яку спирались наші дослідження.

Розроблений метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності є чутливим, добре відтворюваним тестом для кількісної оцінки стану популяції еритроцитів того чи іншого донора при різних патологіях. Можна також стверджувати, що він є чутливим інформативним тестом для кількісної оцінки стану популяції еритроцитів як в нативному стані, так і за дії зовнішніх чинників, наприклад, температури. Добре узгодження отриманої величини коефіцієнта теплового розширення площі поверхні еритроцитів, розрахованого за нашими експериментальними даними, з отриманими іншим методом [185], надає можливість використання

нашого методу для дослідження впливу різних чинників на цей важливий біофізичний параметр біологічних мембран. Цьому сприяє також і більша доступність нашого методу для рутинних досліджень

ПІДСУМОК

Плазматичні мембрани клітин є важливими структурами, що забезпечують умови їх життєдіяльності. Дослідження механізмів проникності біологічних мембран є плідним шляхом пізнання закономірностей функціонування живих клітин. З іншого боку, методи вивчення проникності забезпечуються тими уявленнями про процеси, що відбуваються на мембранному та клітинному рівнях в умовах експерименту.

Ми отримали вираз для джерела ентропії багатокомпонентного розчину з урахуванням рівнянь руху окремих його компонентів, що до цього часу не було зроблено [252]. Цей результат є принципово важливим для коректної побудови феноменологічної теорії нерівноважних процесів та усуває недолік попередніх підходів до виводу основних рівнянь термодинаміки необоротних процесів, на які вказувалось у роботі [183]. На відміну від авторів роботи [197], ми розглянули замкнуту рухоми, а не нерухому безмежну плоску мембрану. Одержані нами вирази для транспортних характеристик мембран є більш адекватними для застосування до реальних клітин. Оскільки, співвідношення між коефіцієнтами тертя, які мають прозорий фізичний сенс, із загальновживаними феноменологічними коефіцієнтами широко використовуються для інтерпретації експериментальних даних щодо проникності біологічних мембран важливо було отримати ці вирази за більш загальних припущень.

Для дослідження пасивної проникності клітин було розроблено багато варіантів методів визначення термодинамічних коефіцієнтів, що характеризують процеси масопереносу крізь біологічні мембрани. Майже всі існуючі методи потребують спрощення вихідних рівнянь між потоками речовин та термодинамічними силами для отримання коефіцієнтів. Значення шуканих термодинамічних коефіцієнтів залежать від виду апроксимації та граничних умов, на яких базуються спрощення. В деяких випадках, методи, що використовуються, ґрунтуються на хибних уявленнях про перебіг процесів, які супроводжують перерозподіл речовин крізь клітинні мембрани.

Одним з методів визначення коефіцієнтів проникності, прийнятним саме для еритроцитів внаслідок певних характеристик цих клітин, є метод визначення часу 50%-го гемолізу в гіпотонічному за непроникаючою речовиною середовищі. В теоретичній частині нашої роботи розвинуто уявлення про фізичний механізм гіпотонічного гемолізу, який пояснює основні закономірності цього явища. Отримані результати і аналіз літературних даних свідчать про те, що механізм гіпотонічного гемолізу клітин пов'язаний з флуктуаційним утворенням макроскопічної пори в ізотропно розтягнутій мембрані. Наша теорія [202] не тільки пояснює наявність сферичного періоду при гіпотонічному гемолізі, існування якого обумовлено необхідністю розтягу мембрани до певного рівня і подолання енергетичного бар'єра між станами з нульовим і відмінним від нуля радіусом пори, але і дозволяє визначити його тривалість кількісно. На підставі розробленої теорії створено новий удосконалений метод визначення коефіцієнтів пасивної проникності мембран еритроцитів для електронеутральных речовин, який спирається на аналітичні, а не на чисельні, рішення системи диференціальних рівнянь, що описують процеси трансмембранного масопереносу [192,253,254]. Розробленим експериментальним методом та теоретично досліджено механізми проникання малих електронеутральных молекул крізь мембрани еритроцитів.

Дослідження показали [219,255], що проникання молекул досліджених речовин (спиртів та амідів) здійснюється обома відомими шляхами: по білкових гідрофільних каналах сталого розміру, які блокуються сульфгідрильним реагентом, та крізь ліпідну фазу. Важливим чинником, що впливає на проникання ліпідним шляхом є, як відомо, ступінь гідрофобності молекул, який кількісно характеризується коефіцієнтом їх розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазами. Проведені дослідження яскраво продемонстрували справедливність цього положення. Особливо прозоро це видно на прикладі чотирьох ізомерів бутандіолу, молекули яких, маючи однакові молекулярні маси, відрізняються між собою розташуванням

гідроксильних груп і, внаслідок цього, коефіцієнтами розподілу. Коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами проникності цих ізомерів крізь мембрани нативних еритроцитів та коефіцієнтами розподілу є дуже високим і становить 0,927. Інкубація ж еритроцитів з pCMBS приводить до ще більшої кореляції між цими величинами, яка набуває значення 0,996. Цей результат підтверджує думку, що такі сульфгідрильні реагенти, як pCMBS блокують білкові шляхи проникання малих молекул. Цей результат є важливим з огляду на дискусію, яка існує в науковій літературі між Solomon [26,27,119] і Masey [10,88,98,102] про можливість проникання молекул, більших за воду, крізь білкові канали. Також існують розбіжності в трактуванні залишкової проникності, тобто після інкубації з сульфгідрильним реагентом. Була висловлена думка [24], що залишкова проникність молекул здійснюється не крізь ліпід, як запропонував Masey [87], а тими ж білковими каналами, але меншою мірою внаслідок конформаційних змін білка, що утворює канал. Наші результати суперечать цій сентенції. Якби це було так, зокрема для амідів та діолів, тоді меншого пригнічення зазнавали б менші за розмірами молекули. За нашими ж даними найбільшого пригнічення зазнають потоки саме малих гідрофільних неелектролітів, таких як ацетамід, етиленгліколь, 1,2-пропандіол, які у випадку нативних еритроцитів мають достатньо великі коефіцієнти проникності. В той же час, менших змін зазнають коефіцієнти проникності тих речовин, молекули яких гірше проникають крізь мембрани нативних еритроцитів саме внаслідок стеричних обмежень (диметилацетамід, 1,3-пропандіол, триетиленгліколь), а також тих речовин, коефіцієнти розподілу яких між гідрофільною та гідрофобною фазами мають порівняно великі значення (диметилацетамід, диметилформамід, 2,3- та 1,2-бутандіол). До того ж, на користь нашої інтерпретації свідчать дані про проникність штучних ліпідних бішарів до ацетаміду та 1,4-бутандіолу [57], які є дуже близькими до величин проникності, отриманих нами для оброблених pCMBS еритроцитів. Про проникання ліпідним шляхом свідчить також сильна кореляція між коефіцієнтами розподілу та коефіцієнтами проникності діолів

та амідів (0,94) крізь мембрани еритроцитів, проінкубованих з pCMBS. Для проникання цим шляхом також характерна обернена залежність від об'єму проникаючих молекул. Проникність же крізь білкові гідрофільні канали характеризується більш критичною залежністю від діаметра молекул. При перевищенні цим параметром величини $4\text{\AA}$ коефіцієнт проникності явно зменшується для більш гідрофільних молекул. З іншого боку, збільшення гідрофільності може навіть зменшувати проникність крізь пору через збільшення енергії зв'язку з молекулами води, і, отже, збільшення ефективного розміру молекул, як у випадку 1,3-пропандіолу та гліцерину. Для більш гідрофобних речовин, наприклад бутандіолів, зменшення проникності по білкових каналах проявляється в зменшенні відсотку блокування проникності, хоча загальна проникність зростає за рахунок збільшення проникності крізь ліпідний бішар.

Висновок про важливість розмірів молекул для проникання крізь білкові гідрофільні канали підтверджують також дані для низки етиленгліколь-діетиленгліколь-триетиленгліколь. Хоча, як вже зазначалось, більш критичним параметром для проникання крізь пори є діаметр, тобто менший лінійний розмір молекули (це пов'язано з тим, що, якщо обидва лінійні розміри молекули перевищують розмір пори, то проникання взагалі неможливо), але і її довжина також має значення. Теоретичний розгляд проникання малих прямоланцюгових молекул крізь білкові пори сталого розміру, проведений на підставі простих фізичних та геометричних міркувань [218], наочно показав залежність здатності молекули до проникання крізь гідрофільні білкові канали від цих параметрів. При розрахунках, як і в роботі [26], ми вважали, що проникання молекул неелектролітів крізь пору здійснюється разом з гідратною оболонкою. В своїй роботі [27] Solomon припускає, що механізм проникання амідів крізь водну пору відрізняється від такого для діолів. Він вважає, що аміди, на відміну від діолів, внаслідок більшої енергії водневих зв'язків з водою, при входженні в канал повинні обміняти ці зв'язки на водневі зв'язки зі стінками

пори. Але, на наш погляд, якщо енергія водневих зв'язків для амідів і є дещо більшою, то це може бути лише додатковою підставою не розставатися зі своєю гідратною оболонкою. До того ж, отримані нами результати свідчать про те, що проникання як діолів, так і амідів, дотримуються однакових закономірностей. На користь нашої інтерпретації свідчать також результати дослідження проникності гліцерину та його ефірних похідних. Виявилось, що, незважаючи на надзвичайно високу гідрофільність, молекули гліцерину не проникають крізь гідрофільні білкові канали. В той же час, молекули його ефірних похідних, які мають такий самий діаметр і навіть більшу довжину, здатні проникати цим шляхом. Враховуючи, що енергія водневих зв'язків гліцерину з водою є більшою, ніж така у його ефірних похідних [220], можна зробити висновок, що це ще не може бути причиною для здійснення запропонованого Solomon [27] механізму проникання крізь пору шляхом обміну водневих зв'язків з водою на водневі зв'язки зі стінками пори. За теорією пор Мулінза [212] молекули, розміри яких не відповідають розмірам пори (є більшими або меншими), виявляються недостатньо сольватованими стінками пори і не можуть увійти в неї. Тому, сольватуюча пора буде проникною для молекули при цілковитій відповідності розмірів молекули і пори. Отримані нами обернені залежності проникності діолів та амідів крізь водну пору від розмірів молекул, які є монотонними (без екстремумів) з коефіцієнтами кореляції $>0,9$, краще узгоджуються з версією проникання молекул разом з гідратною оболонкою, ефективна товщина якої залежить від гідрофобності молекули. Теоретичний розрахунок проникності крізь пору, що має діаметр $12 \text{ \AA}$ (згідно з припущенням Solomon [26]), для діолів, амідів, та ефірних похідних гліцерину дає цілком задовільне узгодження з експериментально виміряними величинами.

Той факт, що одним з найважливіших параметрів, який визначає проникання молекул крізь мембранні структури, є їх гідрофобність, або гідрофільність, ще раз підкреслює ведучу роль водного середовища у перебігу біологічних процесів. Температура є невід'ємним чинником

зовнішнього середовища, що впливає на структуру та взаємодію біологічних молекул та води. Вивчення температурних залежностей проникності мембран еритроцитів показало складний характер відгуку біологічних мембран на зміну температури [256]. Аналіз отриманих результатів проникності мембран еритроцитів для 1,2-пропандіолу і диметилсульфоксиду та апроксимація експериментальних точок в окремих температурних діапазонах свідчать про існування термоіндукованих змін енергії активації проникності при температурах 8-12°C, 18-20°C для обох досліджених речовин, а також при 28-30°C для ДМСО та більш широкий діапазон 25-30°C для 1,2-ПД. Оскільки для всіх донорів температури зламів і зміни енергії активації процесу проникання є аналогічними для обох речовин, маємо всі підстави вважати, що отримані результати не є випадковими. Отримані нами зміни в ході температурних залежностей пасивної проникності мембран еритроцитів людини до неелектролітів (1,2-ПД та ДМСО) узгоджуються з величезною кількістю існуючих наразі експериментальних даних щодо впливу температури на біологічні системи взагалі та мембрани еритроцитів зокрема. Визначені температури зламів ареніусових залежностей лежать в інтервалах температур, відомих як критичні, в яких відбуваються зміни швидкостей багатьох біологічних процесів, пов'язаних з мембранами еритроцитів.

Отримані температурні залежності пасивної проникності мембран еритроцитів людини до неелектролітів показують, що при зниженні температури середовища від фізіологічної (тобто від 37°C) енергія активації пасивного проникання неелектролітів крізь мембрану поступово збільшується і набуває при цьому найбільшого значення в інтервалі температур 25-20°C. Слід зазначити, що залежність величини видимої енергії активації від температури в інтервалі 25-30-37°C є більш пологою, ніж в інших точках зламів, що свідчить про безперервні поступові зміни стану мембрани. Скоріше за все це пов'язано із поступовим збільшенням текучості мембрани з температурою без різких змін у фазовому стані ліпідів, оскільки біологічні мембрани є багатокомпонентними системами. Згідно з правилом

фаз Гібса двокомпонентна система при існуванні двох фаз (наприклад, твердої та рідкої) має два ступеня свободи. Іншими словами, двокомпонентна система в загальному випадку не характеризується чітко вираженою температурою плавлення (тобто такою, що відповідає єдиній точці), оскільки при зміні температури в деяких межах в системі співіснують дві фази. В багатокомпонентній системі цей процес є ще більш складним [222].

Очевидно, що при температурі 20°C цей процес переходить з кількісної фази в якісну. Різке зменшення енергії активації пасивного проникання неелектролітів при цій температурі може бути наслідком розділення фаз в багатокомпонентній фосфоліпідній системі, на яку вказують і автори роботи [145]. Цей процес приводить до появи дефектів упаковки ліпідних молекул на границях розділу фаз, і, отже, до збільшення проникності. Енергія активації в діапазоні 20-12°C набуває низьких значень. Повторне ж різке збільшення енергії активації пасивного проникання електронеутральних молекул при температурах 12-8°C пов'язано з глобальним структурним переходом в мембранах еритроцитів, в який залучені всі компоненти мембрани - як ліпідні, так і білкові. При цьому структурний перехід торкається як периферійних білків цитоскелетного комплексу, так і інтегральних білків мембрани, зокрема білка смуги 3, що пов'язаний як з білками цитоскелету через білок смуги 4.1, так і з ліпідами [96,97,143]. Залучення до структурного переходу, що відбувається в інтервалі температур 12-8°C, інтегрального білка смуги 3 призводить, очевидно, до різкого зменшення проникності по білкових каналах, або зовсім усуває цей шлях проникання малих електронеутральних молекул. Існування різкого зламу ареніусових залежностей в цьому діапазоні температур і для проникання молекул води [46] узгоджується з такою інтерпретацією. Таким чином, проведені дослідження температурної залежності проникності мембран еритроцитів людини для молекул неелектролітів свідчать про складний характер процесів взаємодії мембран з проникаючими речовинами, що

обумовлено як структурою мембран та фізико-хімічними властивостями молекул цих речовин, так і їх взаємодією з водним середовищем.

Важливою характеристикою червоних кров'яних клітин є їх унікальна форма, яка забезпечує найкращі умови для обміну киснем та інших метаболітів з оточуючим середовищем і проходження цих клітин крізь найменші капіляри в циркуляційному руслі. Проведений в роботі теоретичний розгляд процесу гіпотонічного гемолізу в розчинах не проникаючої крізь мембрану речовини дозволив розробити оригінальний і простий метод визначення щільності розподілу еритроцитів в популяції того чи іншого донора за індексом сферичності. Одержані чисельні значення індексів сферичності центрів розподілів відповідають відомим з літератури величинам об'єму та площі поверхні мембран еритроцитів [18-20,173-178]. Але відомі методи визначення геометричних параметрів еритроцитів (безпосереднім спостереженням під мікроскопом [173,174], методом інтерференційної голографії, котрий дозволяє визначити межі клітини більш точно [176], шляхом втягування еритроцитів в мікропіпетку [19]) не дають можливості визначити дійсно середню величину цього параметра, оскільки для цього треба виміряти його для великої кількості клітин, що методом спостереження під мікроскопом практично неможливо. Розроблений нами метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності дає можливість отримати не тільки середнє значення індексу сферичності, але й увесь спектр цього параметра в популяції еритроцитів.

Цінність розробленого нами методу підтверджується великою кількістю робіт, в яких обговорюються різні методи для діагностики таких захворювань як спадковий та набутий сфероцитоз, імунна гемолітична анемія та інші гемолітичні і негемолітичні анемії [257-265]. На відміну від звичайного методу осмотичної крихкості, який завжди застосовується для оцінки стану еритроцитів за таких захворювань (часто в обмеженому вигляді: наприклад, визначають концентрацію солі, яка викликає 50% гемоліз, або відсоток лізису при постійній концентрації [262]), та інших запропонованих

методів тестування (кріогемоліз [259,262], тест на лізис в гліцерині [257,261,266,267,], або дуже дорогий аутоімунний тест [266,268]), розроблений нами метод дає повну картину розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяції того чи іншого донора та має ясний фізичний сенс, кількісно визначаючи відсоток клітин для всіх значень індексу сферичності, що їх мають еритроцити в даній популяції. Звичайно, застосування такого методу не відкидає необхідності дослідження причин захворювань на молекулярному рівні [260,268]. Необхідне (особливо в атипових випадках) вивчення стану мембранних білків і молекулярно-генетичних аспектів захворювань, щоб з'ясувати природу порушень мембрани [260,264,265,268-270]. Але запропонований нами метод є дуже інформативним і достатньо простим для первинного моніторингу з метою виявлення відхилень у стані еритроцитарної популяції.

Дослідження показали, що дана характеристика варіює для різних донорів, відбиваючи таким чином стан популяції еритроцитів окремого донора. При дослідженні великої кількості (понад 50) зразків крові здорових дорослих донорів приблизно у 80% випадків розподіл еритроцитів за індексом сферичності мав вигляд, близький до гаусового, і характеризувався гладким перебігом кривої з одним максимумом. Характерною рисою розподілу еритроцитів за індексом сферичності для груп хворих з ендокринною патологією був бі- та тримодальний вигляд кривих як при гіпер-, так і при гіпотиреозі. У випадку гіпертиреозу серед клітин з нестандартним індексом сферичності більшу питому вагу (біля 25%) мали клітини з меншим індексом сферичності в діапазоні 1,07-1,22. При гіпотиреозі криві частіше мали трьохмодальний вигляд з більшою питомою вагою (біля 30%) сплюснених клітин в діапазоні індексів сферичності 1,65-2,46, ніж близьких до сферичних (біля 3%). В популяціях клітин пуповинної крові людини запропонована характеристика виявляє значну неоднорідність. Індивідуальні криві розподілу еритроцитів пуповинної крові за індексом

сферичності мають, як правило, полімодальний характер і є сумою нормальних розподілів кількох субпопуляцій.

Зниження температури від 37 до 3°C приводить до зсуву максимумів розподілів в область менших індексів сферичності і значного збільшення кількості клітин, що мають низький індекс сферичності, тобто більш наближених до сферичних. Цей результат цілком узгоджується з існуючими наразі уявленнями щодо впливу температури на геометричні параметри еритроцитів та їх осмотичну крихкість. Вважається, що, оскільки внутрішньоклітинний розчин є практично нестисливим, збільшення осмотичної резистентності при підвищенні температури пов'язано зі збільшенням площі поверхні мембрани. За одержаними експериментальними даними зроблена оцінка величини коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів в інтервалі температур від 3 до 37°C. Одержане значення коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцита ($k=2,4 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$) цілком задовільно узгоджується з величиною, виміряною мікропіпетковим методом [185]. Отже, запропонований метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності може бути використаний і для дослідження впливу різних чинників на коефіцієнт теплового розширення площі поверхні їх мембран.

Задовільне узгодження експериментальних та теоретичних значень часів напівгемолізу в низці гіпотонічних розчинів непроникаючої речовини в трьох точках температурного діапазону свідчить про адекватність розробленої фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу, на яку спиралась наші дослідження. Можна також стверджувати, що розроблений метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності є чутливим інформативним тестом для кількісної оцінки стану популяції еритроцитів як в нативному стані, так і за дії зовнішніх чинників, наприклад, температури. Він може також застосовуватись для діагностики стану популяції крові людини при різних захворюваннях. Цьому сприяє також і

доступність нашого методу для рутинних досліджень Крім того, ця характеристика має ясний фізичний та фізіологічний сенс, оскільки форма еритроцита безпосередньо пов'язана з його віком та впливає на спроможність проходити через мікрокапіляри в циркуляційному руслі. Вона є також важливою для підбору зразків крові для подальшого кріоконсервування, оскільки популяція еритроцитів, що має значну фракцію клітин з індексом сферичності, близьким до одиниці, очевидно, буде гірше переносити низькотемпературне консервування, яке супроводжується значними осмотичними навантаженнями.

Таким чином, проведене в роботі теоретичне дослідження процесів масопереносу крізь біологічні мембрани, розробка фізико-математичних моделей гіпотонічного гемолізу дозволила розробити адекватні методи вивчення біофізичних характеристик еритроцитів та їх мембран. За допомогою цих методів з'ясовані механізми проникання низки речовин крізь еритроцитарні мембрани, досліджено вплив температури на стан мембран та їх проникність. Показано, що еритроцитарна популяція є неоднорідною і характеризується розкидом геометричних параметрів еритроцитів. Розподіл еритроцитів за індексом сферичності тісно пов'язаний зі станом здоров'я людини.

ВИСНОВКИ

1. Існуючі наразі способи визначення індексу сферичності еритроцитів та коефіцієнтів проникності їх мембран є або занадто трудомісткими, методично складними та багатокоштовними, або ґрунтуються на теоретичних уявленнях, які не погоджуються із сучасними експериментальними даними. Враховуючи наявність безпосереднього зв'язку між цими показниками та структурою клітинних мембран і функціонуванням еритроцитів, необхідно, по-перше, вдосконалити способи їх визначення як з боку теоретичного обґрунтування, так і з боку технічного рішення і, по-друге, довести доцільність використання їх вимірювання в якості тесту в медичній діагностиці та для дослідження структури біомембран і функціонального стану клітин.

2. На підставі фізико-математичного аналізу процесів гіпотонічного гемолізу та розсіяння світла сфероцитами розроблено швидкий автоматизований метод визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини до електрично нейтральних речовин та метод визначення розподілу цих клітин за індексом сферичності.

3. За розробленим методом визначено коефіцієнти проникності мембран немодифікованих та оброблених блокатором білкових каналів (pCMBS) еритроцитів людини для діолів, амідів, гліцерину та його моноалкілових ефірів (18 речовин).

4. Встановлено, що досліджені речовини проникають в клітини як крізь білкові гідрофільні канали сталого розміру, утворені інтегральним білком смуги 3, так і безпосередньо крізь ліпідний бішар.

5. На підставі аналізу отриманих експериментальних даних показано, що проникання молекул досліджених речовин крізь білкові канали здійснюється разом з молекулами води, що утворюють їх гідратну оболонку.

6. Проникання молекул низки досліджених речовин крізь білкові гідрофільні канали різко зменшується через стеричні обмеження, якщо діаметр молекул проникаючої в клітини речовини перевищує 4 Å.

7. Проникання молекул низки досліджених речовин безпосередньо крізь ліпідний бішар сильно корелює ($r=0,94-0,99$) з коефіцієнтами їх розподілу в системі “n-октанол - вода” та обернено пропорційно залежить від об’єму проникаючих молекул.

8. Шляхом дослідження впливу температури на коефіцієнти проникності мембран еритроцитів людини для 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду встановлено існування термоіндукованих структурно-фазових перетворень в мембранах цих клітин за температур 8-12°C, 18-20°C та 28-30°C.

9. За допомогою розробленого нами методу показано, що розподіл за індексом сферичності здорових дорослих донорів є близьким до гаусового з максимумом за середніх значень індексу сферичності 1,48.

10. Для хворих з ендокринною патологією розподіл еритроцитів за індексом сферичності є бі- або три модальним, як при гіпер-, так і при гіпотиреозі.

11. При гіпертиреозі біля 25% еритроцитів мають аномально малий індекс сферичності (1,07-1,22), тоді як при гіпотиреозі біля 30% клітин мають збільшений порівняно з нормою індекс сферичності (1,65-2,46), тобто підвищується питома вага сплюснених еритроцитів.

12. Зниження температури від 37°C до 3°C приводить до зсуву розподілу еритроцитів за індексом сферичності в область менших значень за рахунок теплового стискання їх мембран. Розрахований за експериментальними даними коефіцієнт теплового стискання площі поверхні мембран еритроцитів становить $2,4 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$.

13. Вперше отримані співвідношення між транспортними характеристиками клітинних мембран (коефіцієнт фільтрації, коефіцієнт проникності та коефіцієнт відбиття для електронейтральної розчиненої речовини) та коефіцієнтами тертя між окремими компонентами для рухомої мембрани довільної форми.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Lovelock J.E. The protective action of neutral solutes against haemolysis by freezing and thawing//Biochem.J.-1954.-56,N3.-P.265-270.
2. Kedem O., Katchalsky A. Thermodynamic analysis of the permeability of biological membranes to non-electrolytes//BBA.-1958.-27.-P.229-246.
3. Paganelli C.V., Solomon A.K. The rate of exchange of tritiated water across the human red blood cell membrane//J.Gen.Physiol.-1957.-41.-P.259-277.
4. Sha'afi R.I., Rich G.T., Mikulecy D.C., Solomon A.K. Determination of urea permeability in red cell by minimum method//J.Gen.Physiol.1970.-55.-P.427-450.
5. Wessels J.M.C., Pals D.T.F. Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes.I.Reexamination of the osmotic lysis method//BBA.-1973.-291.-P.165-177.
6. Solomon A.K., Toon M.R., Dix J.A. Osmotic properties of human red cells//J.Membr.Biol.-1986.-91.-P.259-273.
7. Toon M.R., Solomon A.K. Permeability and reflection coefficients of urea and small amides in human red cell//J.Membr.biol.-1996.-153.-P.137-146.
8. Mazur P., Miller R.H. Permeability of the human erythrocytes to glycerol in 1 and 2M solutions at 0 and 20°C//Cryobiology.-1976.-13.-P.507-522 .
9. Levitt D.G. A new theory of transport for cell membrane pores.1.General theory and application to red blood cells//BBA.-1974.-373.-P.115-131.
10. Macey R.I., Karan D.M. Independence of water and solute pathways in human RBC's//J.Membr.biol.-1993.-134.-P.241-250.
11. Garrick R.A., Patel B.C., Chinard F.P. Effects of sulfhydryl and other reagents on the diffusional permeability of dog erythrocytes to small solutes//BBA.-1983.-734.-P.105-113.
12. Saari J.T., Beck J.S. Probability density function of the red cell membrane permeability coefficient//Biophys.J.-1974.-14.-P.33-38.
13. Козлов М.М., Маркин В.С. Теория осмотического лизиса липидных везикул//Биол. мембраны.-1984.-1.-С.74-78.

14. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И. О механизме осмотического лизиса эритроцитов//Криобиология.-1986.-2.-С.23-25.
15. Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С. Физические основы низкотемпературного консервирования клеточных суспензий. -К.:Наукова думка, 1994-143 с.
16. Ellory J.C., Hall A.C.,Amess J.A.C. Passive potassium transport in human red cells//Biomed.Biochim.Acta.-1987.-2.-P.531-536.
17. Леонова В.Г. Анализ эритроцитарных популяций в онтогенезе человека.-Новосибирск: Наука, 1987.-242 с.
18. Rand R.P., Burton A.C. Area and volume changes in hemolysis of single erythrocytes//J.Cell.Comp.Physiol.-1963.-61.-P.245-253.
19. Waugh R.E., Mohandas N., Jackson C.W. et al. Rheological properties of senescent erythrocytes: loss of surface area and volume with red blood cell age//Blood.-1992.-79.-P.1351-1358.
20. Jay A.W. Geometry of the human erythrocyte. I.Effect of albumin on cell geometry//Biophys.J.-1975.-15.-P.205-222.
21. Шайтан К.В., Лобков А.Ф., Тимофеев И.В. и др. Метод лазерного цитомониторинга и его применение для определения размеров эритроцитов//Биол.мембраны.-2002.-19,3.-С.228-236.
22. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Иткин Ю.А. Термодинамическая модель пассивного переноса многокомпонентной жидкости через замкнутую избирательно проницаемую мембрану//Криобиология и криомедицина.-1981.-9.-С.29-36.
23. Goldstein D.A., Solomon A.K. Determination of equivalent pore radius for human red cell by osmotic pressure measurement//J.Gen.Physiol.-1960.-44.-P.1-17.
24. Solomon A.K.,Chasan B., Dix J.A. et al. The aqueous pore in the red blood cell membrane: Band 3 as a channel for anions, cations, nonelectrolytes and water//Biomembranes and cell function.-New York:Ann.N-Y Acad.Sci., 1983.-P.97-124.

25. Dix J.A., Solomon A.K. Role of membrane protein and lipids in water diffusion across cell membranes//BBA.-1984.-773.-P.219-230.
26. Toon M.R., Solomon A.K. Transport parameters in the human red cell membrane:solute-membrane interaction of hydriphilic alcohols and their effect on permeation//BBA.-1990.-1022.-P.57-71.
27. Toon M.R., Solomon A.K. Transport parameters in the human red cell membrane: solute-membrane interaction of amides and ureas//BBA.-1991.-1063.-P.179-190.
28. Owen J.D., Eyring E.M. Reflection coefficients of permeant molecules in human red cell suspensions//J.Gen.Physiol.-1975.-66.-P251-265.
29. Levitt D.G., Mlekoday H.J. Reflection coefficient and permeability of urea and ethylenglycol in the human red cell membrane//J.Gen.Physiol.-1983.-81.-P.239-254.
30. Chen P., Peance D., Verkman A.S. Membrane water and solute permeability determined quantitatively by self-quehching of an entrapped fluorophore// Biochemistry.-1988.-27.-P.5713-5718.
31. Mlekoday H.J., Moore R.,Levitt D.G. Osmotic water permeability of human red cells//J.Gen.Physiol.-1983.-81.-P.213-220.
32. Savitz D., Sidel V.W., Solomon A.K. Osmotic properties of human red cells//J.Gen.Physiol.-1964.-48.-P.79-91.
33. Tatsumi N.,Kimura E. Expansibility of erythrocytes during the course of hypotonic hemolysis//Experientia.-1981.-37.-P.210-212.
34. Jay A.W.L., Rowlands S., Hyslom D.R. Membrane permeability and hemolysis rate of single human red blood cells//Fed.Proc.-1974.-33.-P.1591.
35. Swanson R.E. Hemolysis times as indicators of red cell permeability// Fed.Proc.-1974.-33.-P.1591.
36. Hempling H.G., White S. Permeability of cultured megakaryocytopoietic cells of the rat to Dimethyl Sulfoxide//Cryobiology.-1984.- 21.-P.133-143.

37. Toupin C.J., LeMaguer M., McGann L.E. Permeability of human granulocytes to water: Rectification of osmotic flow//Cryobiology.-1989.-26.-P.431-444.
38. Toupin C.J., LeMaguer M., McGann L.E. Permeability of human granulocytes to dimethyl sulfoxide//Cryobiology.-1989.-26.-P.422-430.
39. Waterman C.S., Atkinson E.E., Wilkins B. et al. Improved measurements of erythrocyte volume distribution by aperture-counter signal analysis//Clin.Chem.-1975.-21.-P.1201-1211.
40. Richieri G.V., Akeson S.P., Mel H.C. Measurement of biophysical properties of red blood cells by resistive pulse spectroscopy: volume, shape, surface area and deformability//J.Biochem.Biophys.Methods.-1985.-11.-P.117-131
41. Conlon T., Outhred R. Water diffusion permeability of erythrocytes using NMR technique//BBA.-1972.-288.-P.354-361.
42. Conlon T., Outhred R. The temperature dependence of erythrocyte water diffusion permeability//BBA.-1978.-511.-P.408-418.
43. Fabry M.E., Eisenstadt M. Water exchange across red cell membranes: Measurement by nuclear magnetic resonance T_1 , T_2 and T_{12} hybrid relaxation//J.Membr.Biol.-1978.-42.-P.375-398.
44. Ashley D., Goldstein J.H. The application of dextran-magnetite as a relaxation agent in the measurement of erythrocyte water exchange used pulsed nuclear magnetic resonance spectroscopy//Biochem.Biophys.Res.Com.-1980.-97.-P.114-120.
45. Lipschitz-Farber C., Degani H. Kinetics of water diffusion across phospholipid membranes. ^1H - and ^{17}O -NMR relaxation studies//BBA.-1980.-600.-P.291-300.
46. Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Жиликова Т.А., Шейкин В.И. Температурная зависимость водной диффузионной проницаемости мембран эритроцитов в средах с различной ионной силой//Биол. мембраны.-1985.-2, N3.-С.310-314.

47. Leibo S.P. Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova//J.Membr.Biol.-1980.-53.-P.170-188.
48. Diller K.R. Bradley D.A. Measurement of the water permeability of single human granulocytes on a microscopic stopped-flow mixing system//Trans. ASME J.Biomech.Eng.-1984.-106.-P.384-393.
49. McGrath J.J. A microscope diffusion chamber for determination of the equilibrium and non-equilibrium osmotic response of individual cells//J.Microsc.-1985.-139.-P.249-263.
50. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Смольянинова Е.И. К вопросу о механизме осмотического лизиса клеток//Биол. мембраны.- 1993.-10,N6.-С.627-631.
51. Gao D.Y., McGrath J.J., Tao J. et al. Membrane transport properties of mammalian oocytes: A micropipette perfusion technique//J.Reprod.Fertil.- 1994.-102.-P.385-392.
52. Cullis P.R., Grathwohl Ch. Hydrocarbon phase transition and lipid-protein interactions in the erythrocyte membrane//BBA.-1977.-471.-213
53. Cullis P.R., Hope M.J., de Kruijff B. and al. Structural properties and functional roles of phospholipids in biological membranes//Phospholipids and cellular regulation. V.1.Permeability properties of lipids/J.F. Kuo ed.- Raton, Florida:CRK Press, 1985.-P.3-52.
54. Fettiplace R.,Haydon D.A. Water permeability of lipid membrane//Physiol. Rev.-1980.-60.-510-550
55. Reeves J.P., Douben R.M. Water permeability of phospholipid vesicles// J.Membrane Biol.-1970.-3.-P.123
56. Fettiplace R. The influence of the lipid on the water permeability of artificial membranes//BBA.-1978.-513.- P.1-10.
57. Finkelstein A. Water and nonelectrolyte permeability of lipid bilayer membranes//J.Gen.Physiol.-1976.-68.-P.127-135.
58. Trauble H. The movement of molecules across lipid membranes.A molecular theory//J.Membrane Biol.-1971.-4.-P.193-202

59. Poznansky M., Tang S., White P.C., Milgram J.M., Selenen M. Non-electrolyte diffusion across lipid bilayer systems//J.Gen.Physiol.-1976.- 67.- P.45-52
60. Safman P.G., Delbruck M. Brownian motion in biological membranes//Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.-1975.-72.-P.3111-3123
61. Cullis P.R. Lateral diffusion rates of phosphatidyl-choline in vesicle membranes. Effect of cholesterol and hydrocarbon phase transitions//FEBS Lett.-1976.-70.-P.233-242
62. Lindblom G., Johansson L.B.A., Arvidson G. Effect of cholesterol in membranes//Biochemistry.-1981.-20.-P.2204-2211
63. Ghosh R., Seelig J. The interaction of cholesterol with bilayers of phosphatidylethanolamine//BBA.-1982.-691.-P.151-159
64. McElhaney R.N. The effect of membrane lipids on permeability and transport in procariotes//Structure and Properties of cell membranes.V.II. Molecular basis of selected transport systems/G.Benga ed.-Florida:CRC Press, 1985.-P.20-51.
65. Israelachvili J.N. Refinement of the fluid mosaic model of membrane structure//BBA.-1977.-469.-P.221-233
66. van Hoogevest P., du Maine A.P.M., de Kruijff B. Characterization of the permeability increase induced by the incorporation of glycophorin in phosphatidylcholine vesicles. Determination of the size of the non-specific permeation pathway//FEBS Lett.-1983.-157.-P.41-48
67. van der Steen A.J.M., de Kruijff B., de Gier J. Glycophorin incorporation increases the bilayer permeability of large unilamellar vesicles in a lipid dependent manner//BBA.-1982.-691.-P.13-21
68. van Hoogevest P., du Maine A.P.M., de Kruijff B., de Gier J. The influence of lipid composition on glycophorin induced bilayer permeability//BBA.-1984.-771.-P.119-130
69. McElhaney R.N., De Gier J., van Deenen L.L.M. The effect of alterations in fatty acid composition and cholesterol content on the permeability of

- Mycoplasma laidlawii* B cells and derived liposomes//BBA.-1970.- 219.- P.245-258.
70. De Gier J., Mandersloot J.G., Hupkes J.V., McElhaney R.N., van Beek W.P. On the mechanism of nonelectrolyte permeation through lipid bilayers and through biomembranes//BBA.-1971.-233.-P.610-618.
 71. Romijn J.C., van Golde L.M.G., McElhaney R.N., van Deenen L.L.M. Some studies on the fatty acid composition of total lipids and phosphatidylglycerol from *Acholeplasma lailawii* B and their relation to the permeability of intact cells of this organism//BBA.-1972.-280.-P.22-31.
 72. De Kruijff B., De Greef W.J., van Eyk R.V.W., Demel R.A., van Deenen L.L.M. The effect of different fatty acid and sterol composition on the erythritol flux through the cell membrane of *Acholeplasma lailawii*// BBA.-1973.-298.-P.479-485.
 73. McElhaney R.N., De Gier J., van derNeut-Kok E.C .M. The effect of alterations in fatty acid composition and cholesterol content on the nonelectrolyte permeability of *Mycoplasma laidlawii* B cells and derived liposomes//BBA.-1973.-298.-P.500-512.
 74. Eze M.O., McElhaney R.N. The effect of alteration in the fluidity and phase state of the membrane lipids on the passive permeation and facilitated diffusion of glycerol in E.coli//J.Gen.Microbiol.-1981.-124.-P.299-307.
 75. Deuticke B., C.Ruska C. Changes of nonelectrolyte permeability in cholesterol-loaded erythrocytes//BBA.-1976.-433.-P.638-653
 76. Grunze M., Deuticke B. Changes of membrane permeability due to extensive cholesterol depletion in mamalian erythrocytes//BBA.-1974.-356.-P.125-130.
 77. Finkelstein A. Reply to a comment on the water permeability through planar lipid bilayers//J.Gen.Physiol.-1977.-70.-P.125-127.
 78. Tien H.T. Black lipid membranes (BLM): Theory and practice.- N-Y, 1974.- 655 p.

79. Stein W.D. The movement of molecules across cell membranes.- New York-London: Academic Press, 1967.
80. Маркин В.С., Козлов М.М. Статистика пор в бислойных липидных мембранах//Биол.мембраны.-1985.-2,12.-С.205-223.
81. Антонов В.Ф. Липидные поры: Стабильность и проницаемость мембран//Соросовский обр.ж.-1998.-10.-С.10-17.
82. Elamrani K., Blume A. Effect of the lipid phase transition on the kinetics of H^+/OH^- -diffusion across phosphatidic acid bilayers//BBA.-1983.-727.-P.22-30.
83. Holz R., Finkelstein A. The water and electrolyte permeability induced in thin lipid membranes by the polyene antibiotics nystatin and amphotericin B//J.Gen.Physiol.-1970.-56.-P.125-145.
84. Cohen B.E. The permeability of liposomes to nonelectrolytes.II.The effect of nystatin and Gramicidin A//J.Membr.Biol.-1975.-20.-P.235-268.
85. Solomon A.K., Gary-Bobo C.M. Aqueous pores in lipid bilayers and red cell membranes//BBA.-1972.-255.-P.1019-1021.
86. Viera F.L., Sha'afi R.I., Solomon A.K. The state of water in human and dog red cell membranes//J.Gen.Physiol.-1970.-55.-P.451-466.
87. Macey R.L., Farmer R.E.L. Inhibition of water and solute permeability in human red cells//BBA.-1970.-211.-P.104-106.
88. Macey R.L. Permeability of red cells to water and non-electrolytes//Transport across biological membranes. V.2-N-Y:Springer-Verlag, 1979.-2.-P.1-57.
89. Brahm J., Wieth J.O. Separate pathway for urea and water, and for chloride in chicken erythrocytes//J.Physiol. London.-1977.-266.-P.727-749.
90. Sha'afi R.I. Feinstein M.B. Membrane water channels and SH-groups//Advances in experimental medicine and biology. Membrane toxicity/M.W.Miller ed.-N-Y:Plenum press,1977.-P.67-80.
91. Brown P.A.M., Feinstein M.B., Sha'afi R.I. Membrane proteins related to water transport in human erythrocytes//Nature.-1975.-254.-P.523-525.

92. Ojcius D.M., Solomon A.K. Sites of p-chloromercuribenzenesulfonate inhibition of red cell urea and water transport//BBA.-1988.-942.-P.73-82
93. Fairbanks G., Steck T.L., Wallach D.F.N. Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane//Biochemistry.-1971.-10.-N12.-P.2606-2617.
94. Bennet V. The membrane skeleton of human erythrocytes and its implications for more complex cells//Ann.Rev.Biochem.-1985.-54.-P.273-304.
95. Jennings M.L. Structure and function of the red blood cell anion transport protein//Ann.Rev.Biochem.Biophys.Chem.-1989.-18.-P.397-420.
96. Wang D.N., Sarabia V.E., Reithmeier R.A., Kuhlbrandt W. Three-dimensional map of the dimeric membrane domain of the human erythrocyte anion exchanger, Band 3//EMBO Journal.-1995.-14.-P.5158-5169.
97. Zhang D., Kiyatkin A, Bolin J.T., Low P.S. Crystallographic structure and functional interpretation of cytoplasmic domain of erythrocyte membrane band 3//Blood.-2000.-96.-N9.-P.2925-2933.
98. Macey R.I. Transport of water and urea in red blood cells//Am. J.Physiol.-1984.-246.-P.195-203
99. Sutherland R.M., Rothstein A., Reed R.I. Erythrocyte membrane sulfhydryl groups and cation permeability//J.Cell.Physiol.-1967.-69.-P.185-198.
100. Knauf P., Law F.Y., Marchant P.J. Relationship of net chloride flow across the human erythrocyte membrane to the anion exchange mechanism//J.Gen.Physiol.-1983.-81.-P.95-126.
101. Falke J.J., Chan S.I. Molecular mechanisms of band 3 inhibition. 3.Translocation inhibitors//Biochemistry.-1986.-25.-P.7899-7906.
102. Macey R.I., Karan D.M., Farmer R.E.L. Properties of water channels in human red cells//in: Passive permeability of cell membranes, Biomembranes, V.3., Plenum Press, N-Y, 1972.-P.331-340.

103. Gary-Bobo C.M., Solomon A.K. Effect of geometrical and chemical constraints on water flux across artifical membranes//J.Gen.Physiol.-1971.-57.-P.610-622.
104. Owen J.D., Steggall M., Eyring E.M. The effect of floretin on red cell nonelectrolyte permeability//J.Membr.Bio.-1974.-19.-P.79-92.
105. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A. The location of disulfonic stilbene binding site in band 3, the anion transport protein of red blood cell membrane//BBA.-1980.-599.-P.127-139.
106. Ramjeesingh M., Gaarn A., Rothstein A. The sulfhydryl groups of the 35,000-dalton C-terminal segment of band 3 are located in a 9000-dalton fragment produced by chymotrypsin treatment of red cell ghosts//J.Bioenerg.Biomemb.-1981.-13.-P.411-423.
107. Rosenberg P.A., Finkelstein A. Water permeability of gramicidin A treated lipid bilayer membranes//J.Gen.Phys.-1978.-72.-P.341-350.
108. Verkman A.S., Dix J.A., Solomon A.K. Anion transport inhibitor binding to band 3 in red cell membranes//J.Gen.Physiol. -1983.-81.-P/421-449.
109. Snow J.W., Brands J.F., Low P.S. The effects of anion transport inhibitors on structural transitions in erythrocyte membranes//BBA.-1978.-512.-P.579-591.
110. Naccache P., Sha'afi R.I. Effect of PCMBS on water transfer across biological membranes//J.Gen.Physiol.-1974.-83.-P.449-456.
111. Brahm J. Diffusional water permeability of human erythrocytes and their ghosts//J.Gen.Physiol.-1982.-79.-P.791-819.
112. Deuticke B. Properties and strucrural basis of simple diffusion pathways in the erythrocyte membrane//Rev.Physiol.Biochem. Pharmacol.-1977.-78.-P.1-97.
113. Preston G.M., Carroll T.P., Guggino W.B., Agre P. Appearance of water channel in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein//Science.-1992.-256.-P.385-387.

114. Agre P., Preston G.M., Smith B.L. et al. Aquaporin Chip: the archetypal molecular water channel//*Am.J.Physiol.*-1993.-265.-P.463-476.
115. Zeidel M.L., Neilsen S., Smith B.L. et al. Ultrastructure, pharmacologic inhibition and transport selectivity of aquaporin channel-forming integral protein in proteoliposomes//*Biochemistry.*-1994.-33.-P.1606-1615.
116. Shi L., Skach W.R., Verkman A.S. Functional independence of monomeric CHIP28 water channels revealed by expression of wild-type mutant heterodimers//*J.Biol.Chem.*-1994.-269.-P.10417-10422.
117. Van Hock A.N., Luthjens L.H., Hom M.L. et al. A 30 kDa functional size for the erythrocyte water channel determined in situ by radiation inactivation//*Biochem.Biophys.Res.Comm.*-1992.-184.-P.1331-1338.
118. Preston G.M., Smith B.L., Zeidel M.L. et al. Mutations in aquaporin-1 in phenotypically normal humans without functional CHIP water channels//*Science.*-1994.-265.-P.1585-1587.
119. Solomon A.K. Do water and urea cross the red cell membrane through the same channel?//*Isitonic transport in leaky epithelia.*-Mauksgaard, Copoenhagea, 1993.-P.450-483.
120. Mathai J.C., Mori S., Smith B.L. et al. Red cell membrane water transport in the aquaporin-1 (AQP1) deletion phenotype//*FASEB J.*-1995.-9.-P.3263.
121. Mannuzzu L.M., Moronne M.M., Macey R.I. Estimate of the number of urea transport sites in erythrocyte ghosts using a hydrophobic mercurial//*J.Membrane Biol.*-1993.-133.-P.85-97.
122. Zeidel M.L., Ambudkar S.V., Smith B.L., Agre P. Reconstitution of functional water channels in liposomes containing purified red cell CHIP28 protein//*Biochemistry.*-1992.- 31.-P.7436-7440.
123. Van Hock A.N., Verkman A.S. Fractional reconstruction of the isolated erythrocyte water channel CHIP28//*J.Biol.Chem.*-1992.-267.-P.18267-18269.
124. Ishibashi K., Sasaki S., Fushimi K. et al. Molecular cloning and expression of a member of the aquaporin family with permeability to glycerol and urea in

- addition to water expressed at the basolateral membrane of kidney collecting duct cells//Proc.Nath.Acad.Sci.USA.-1994.-91.-P.6269-6273.
125. Toon M.R., Solomon A.K. Inhibition of red cell urea flux by anion exchange inhibitors//BBA.-1994.-1193.-P.276-286.
 126. Toon M.R.,Solomon A.K. Modulation of water transport in human red cells: effect of urea//BBA.-1988.-940.-P.266-274.
 127. Katchalsky A.,Curran P.F. Nonequilibrium thermodynamics in biophysics.- Cambridge: Harvard University Press, 1965.-248 p.
 128. Dainty J., Ginzburg B.Z. Water rotations of plant cells//J.Theor.Biol.-1963.-5.-256-265.
 129. McElhaney R.N. Effects of membrane lipids on transport and enzymic activities in Membrane Lipids of Procaryotes /Current Topics in membranes and Transport, Vol.17.- N-Y: Academic Press,1982.-317 p.
 130. Sandermann H. Regulation of membrane enzymes by lipids//BBA.-1978.-515.-P.209.
 131. Raison J.K. The influence of temperature-induced phase changes on the kinetics of respiratory and other membrane-associated enzyme systems//Bioenergetics.-1973.-4.-P. 285.
 132. Han M.N. Non-linear Arrhenius plots in temperature drpendent kinetic studies of enzyme reactions. 1. Single transition processes//J Theo.Biol.-1972.-35.-P.543.
 133. Gardiner W.C. Temperature dependence of bimolecular gas reaction rates//Acc.Chem.Res.-1977.-10.-P.326.
 134. Bagnall D.J., Wolfe J. Arrhenius plots:information or noice?//Cryo-Lett.-1982.-3.-P.7.
 135. Wynn-Williams A.T. An explanation of apparent sudden change in the activation energy of membraneenzymes//Biochem.J.-1976.-157.-P.279.
 136. Jahnig F., Bramhall J. The origin of break in Arrhenius plots of membrane process//BBA.-1982.-690.-P.310.

137. Thilo L., Trauble H., Overath P. Mechanistic interpretation of influence of lipid phase transitions on transport functions//Biochemistry.- 1977.-16.-P.1283.
138. Silvius J.R., McElhaney R.N. Membrane lipid physical state and modulation of the $\text{Na}^+, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase activity in *Acholeplasma laidlawii* B//Proc.Nath.Acad.Sci.U.S.A.-1980-77.-P.1255.
139. Silvius J.R., McElhaney R.N. Nonlinear Arrhenius plots and analysis of reaction and motional rates in biological membranes//J.Theor.Biol.-1980.-88.-P.135.
140. Sprague E.D., Larrabee C.E., Halsall H.B. Statistical evaluation of alternative models: application to ligand-protein binding//Anal.Biochem.-1980.-101.-P.175.
141. Forte T., Leto T.L., Minetti M., Marchesi V.T. Protein 4.1 is involved in structural thermotropic transition of red blood cell membrane detected by spin-labeled stearic acid//Biochemistry.-1985.-24.-P.7876-7880.
142. Белоус А.М., Бондаренко В.А. Структурные изменения биологических мембран при охлаждении.-К.: Наук.думка,1982.-256 с.
143. Черницкий Е.А., Воробей А.В. Структура и функции эритроцитарных мембран.- Минск: Наука и техника,1981.- 216 с.
144. Galla H.J., Luisetti J. Lateral and transversal diffusion and phase transition in erythrocyte membranes//BBA.-1980.-596.-P.108-117.
145. Minetti M., Ceccarini M., Di Stasi A.M.M. Role of membrane thermotropic properties on hypotonic hemolysis of human red blood cells//J.Cell.Biochem.-1984.-25.-P.61-72.
146. Lacko L., Wittke B., Geck P. The temperature dependence of the exchange transport of glucose in human erythrocytes//J.Cell.Physiol.-1973.-82,2.-P.213-218.
147. Болдырев А.А. Возможные причины нелинейности графиков Аррениуса для Na^+, K^+ -зависимой аденозинтрифосфатазы//

- Биомакромолекулы в методе спиновых меток и зондов.- М.:Наука,1988.- С.80-92.
148. Plagemann P.G.W., Wohlhueter R.M. Effect of temperature on kinetics and differential mobility of empty and loaded nucleoside transporter of human erythrocytes//J.Biol.Chem.-1984.-259.-,14.-P.9024-9027.
 149. Черницкий Е.А., Воробей А.В., Конев С.В. Термические переходы в эритроцитарных мембранах, выявленные по проницаемости их к АНС//Биофизика.-1978.-23,1.-С.80-84.
 150. Block M.C., Neut-Kok E.C.M., Deenen H.H.M., Gier J. The effect of chain length and lipid phase transitions on the selective permeability properties of liposomes//BBA.-1975.-406,2.- P.187-196.
 151. Цымбал Л.В. Влияние неспецифических факторов на динамическую структуру цитоплазмы эритроцитов//Пробл.криобиол.-2000.-3.-С.8-14.
 152. Цымбал Л.В., Гаврилова И.И., Моисеев В.А. Исследование влияния полиспиртов на динамическую структуру биологических мембран методом спиновых зондов//Криобиология.-1985.-3.-С.20-24.
 153. Цымбал Л.В., Моисеев В.А. Влияние криопротекторов на мембраносвязанные и цитозольные белки эритроцитов// Пробл.криобиол.-1992.-2.-С.13-19.
 154. Barber M.J., Rosen G.M., Rauckman E.J. Studies of the mobility of maleimide spin labels within the erythrocyte membrane//BBA.-1983.-732.- 126-132.
 155. Pasternack G.R., Anderson R.A., Leto T.L., Macchesi V.T. Interaction between protein 4.1 and band 3//J.Biol.Chem.-1985.-260,6.-P.3676-3683.
 156. Green F.A., Jung C.J. Cold induced haemolysis in hypertonic millieu//J.Membr.Biol.-1977.-33.-P.249-263.
 157. Williams R.J.,Takahashi T. Microscopic observation of human red cells undergoing thermal shock//Cryobiology.-1979.-16.-P.589.
 158. Williams R.J.,Takahashi T. Erythrocyte metastability: microscopic observation of thermal shock hemolysis//Cryoletters.-1984.- 5.-P.111-117.

159. Takahashi T., Erbe E.F., Steere R.L. et al. Further studies of thermal shock in human erythrocytes using freeze-fracture and ESR//Cryobiology.-1983.-20.-P.725-726.
160. Takahashi T., Noji S., Erbe E.F. et al. Cold shock hemolysis in human erythrocytes studies by spin probe method and freeze-fracture electron microscopy//Biophys.J.-1986.-49.-P.403-410.
161. Drost-Hansen W. Water at biological interfaces - structural and functional aspects//Phys.and Chem.Liquids.-1978.-7.-P.243-348.
162. Кочнев И.Н., Халоимов А.И., Григорьев Е.И. и др. Влияние аминокислот и низко-молекулярных пептидов на динамику воды.//Биофизика.-2002.-47,1.-с.12-19.
163. Кяйвяряйнен А.И. Термодинамический анализ процессов в трехкомпонентной системе вода-ионы-макромолекулы//Биофизика.-1988.- 33,3.-С.540.
164. Tirri L.J., Schmidt P.C., Pullarkat R.K., Brpckerhoff H. Stidues on the hydrogen belts of membranes: II. Non-electrolyte permeability of liposomes of diester, diether, and dialkyl phpsphatidilcholine and cholesterol//Lipids.-1977.-12.-P.863-868.
165. Рябов С.И., Шостка Г.Д. Молекулярно-генетические аспекты эритропоэза.- Л.:Медицина, 1973.-280 с.
166. Шашкин А.В., Терсков И.А. Продукция и деструкция эритроцитов в организме.- Новосибирск: Наука, 1986.-89 с.
167. Weed R.I. Editorial: the impotence of erythrocyte deformability//Am.J.Med.-1970.-49.-P.147.
168. Skutelsku R., Lotan R., Sharon N., Danon D. Distribution of the tantigen on erythroid cell surface: studies with plantet agglutini an anti-T specific lectin//BBA.-1977.-467.-P.165-174.
169. Tillman W., Schroter W. Rheological of erythrocytes in heterozygous and homozygous β -thalassaemia//Brit.J.Haematol.-1979.-43.-P.401-411.

170. Ferrant A. The role of the spleen in haemolysis//Clin.Hematol.-1983.-12.-P.489-505.
171. Williams E.D., Szus L., Glass H.I. et al. Measurement of red blood cell destruction in the spleen//J.Lab.Clin.Med.-1974.-84.-P.135-146.
172. LaCelle P.L., Evans E.A., Hochmuth R.M. Erythrocyte membrane elasticity, fragmentation and lysis//Blood Cells.-1977.-3.-P.335-347.
173. Canham P.B., Parkinson D.R. The area and volume of single human erythrocytes during gradual osmotic swelling to hemolyses//Can.J.Physiol. Pharmacol.-1970.-48.-P.369-376.
174. Canham P.B., Burton A.C. Distribution of size and shape in populations of normal human red cells//Circ.Res.-1968.-22.-P.405-422.
175. Chien S., Usami S., Dellenback R.J., Bryant C.A. Comparative hemorheology-hematological implicatio of species differences in blood viscosity//Biorheology.-1971.-8.-P.35-57.
176. Fung Y.C., Tsang W.C.O., Patitucci P. High-resolurion data on the geometry of red blood cells//Biorheology.-1981.-18.-P.369-385.
177. Evans E.S., Fung Y.C. Improved measurement of the erythrocyte geometry//Microvas.res.-1972.-4.-P.335-347.
178. Fung Y.C. Biomechanics: Mechanical properties of tissues.- N-Y: Springer-Verlag, 1981.-108 p.
179. Кассирский И.А., Алексеев Г.А. Клиническая гематология.- М.:Медицина, 1970.-800 с.
180. Гордієнко О.І., Македонська В.О., Коваленко І.Ф., Алексєєва Л.І. Щільність ймовірності розподілу клітин за індексом сферичності в популяціях еритроцитів хворих на гіпо- та гіпертиреоз//Вісник Харк.унів., 2001.-528.- Біофізичний вісник.-Вип.2(9).-С.67-70.
181. Прокопюк О.С. Лечение постгеморрагических анемий в акушерско-гинекологической практики с использованием криоконсервированных эритроцитов плацентарной крови: автореф.дис...канд.мед.наук: 03.00.22/ИПКиК НАНУ.-Х., 1989.-22 с.

182. Коций С.В. Криопротекторы ряда алкоксизамещенных глицерина (синтез, физико-химические свойства): Дис...канд. хим. наук: 02.00.04; 03.00.22.-Харьков-Черноголовка, 1992.-145 с.
183. Дьярмати И. Неравновесная термодинамика. Теория поля и вариационные принципы: Пер. с англ.-М.:Мир. 1974.-304 с.
184. де Гроот С., Мазур П. Неравновесная термодинамика: Пер. с англ.-М.:Мир, 1964.-456 с.
185. Ивенс И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран: Пер. с англ.-М:Мир,1982.-304 с.
186. Ланда П.С. Автоколебания в системах с конечным числом степеней свободы.-М.: Наука, 1980.-359 с.
187. Хапшель Дж., Бреннер Г. Гидродинамика при малых числах Рейнольдса: Пер. с англ.-М.:Мир, 1976.-630 с.
188. Марри Дж. Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии. Лекции о моделях: Пер.с англ.-М.: Мир, 1983.-397 с.
189. ван де Хюлст Г. Рассеяние света малыми частицами: Пер. с англ.-М.: Изд-во ин. лит., 1961.-536 с.
190. Борен К., Хафман Д. Поглощение и рассеяние света малыми частицами: Пер. с англ.-М.: Мир, 1986.- 860 с.
191. Дьяконов В.П. Справочник по алгоритмам и программам на языке бейсик для персональных ЭВМ.- М.: Наука, 1987.-240 с.
192. Пат. 41098А (Україна) МПК⁷ G01N33/49. Спосіб визначення коефіцієнта проникності еритроцитів для електрично нейтральних речовин./ Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І.,Гордієнко Ю.Є., Коваленко І.Ф.//2001.-Бюл.№7.
- 193 Пат. 47910А (Україна) МПК⁷ G01N33/49. Спосіб визначення щільності ймовірності розподілу еритроцитів за індексом сферичності/Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Гордієнко Ю.Є., Коваленко І.Ф., Алексєєва Л.І.//2002.-Бюл.№7.

194. Стейнкамп Дж.А. Цитометрия в потоке (обзор).-Приборы для научных исследований.-1984.-9.-с.3-28.
195. Meyer R.A. Light scattering from biological cells: dependence of backscatter radiation on membrane thickness and refractive index//Appl.Opt.-1979.-18.-P.585-588.
196. Левтов В.А., Регирер С.А., Шадрина Н.Х. Реология крови.-М.: Медицина, 1982.-272 с.
197. Kedem O., Katchalsky A. A physical interpretation of the phenomenological coefficients of membrane permeability//J.of Gen.Physiol.-1961.-45.-P.143-179.
198. Слейчер Р. Водный режим растений.-М.:Мир,1970.-365 с.
199. Rand R.P. Mechanical properties of the red cell membrane .I.Viscoelastic breakdown of the membrane//Biophys.J.-1964.-4.-P.303-316.
200. Эбелинг В. Образование структур при необратимых процессах.-М.:Мир,1979.-179с.
201. Гордиенко Е.А., Панина Ю.Е. Физико-математическая модель явления гипотонического гемолиза эритроцитов человека. II. Этап гемолиза// Вісник Харк. ун-ту.- 1998. -422. -Біофіз. вісник, вип.2.-С.54-58.
202. Gordienko E.A., Gordienko Yu.E., Gordienko O.I. The physico-mathematical theory of human erythrocyte hypotonic hemolysis phenomenon//Cryo Letters.-2003.-24, 4.-P.229-44.
203. Ліннік Т.П. Фізико-хімічні фактори кріопшкоджень і кріозахисту сперматозоїдів півнів у циклі низькотемпературного консервування: Автореф. дис...докт.біол.наук: 03.00.19/ ІПКіК НАНУ.-Харків, 2003.-36 с.
204. Физер Л., Физер М. Органическая химия. т.1.-М:Химия.-1970.-688с.
205. Маленков Г.Г. Геометрия построек из молекул воды в структурах кристаллогидратов//Ж. структ.химии.-1962.-3, №2.-С.220-243.
206. Ивков В.Г., Берестовский Г.Н. Динамическая структура липидного бислоя.-М.: Наука, 1981.-296 с.

207. Виноградов С. Структурные аспекты водородной связи в аминокислотах, пептидах, белках и модельных системах //В кн.: Молекулярные взаимодействия.-М.: Мир, 1984.-С.184-227.
208. Белоусов В.П., Панов М.Ю. Термодинамика водных растворов неэлектролитов.-Л.: Химия, 1983.-265 с.
209. Ralston G.B., Crisp E.A. The action of organic mercurials on the erythrocyte membrane//BBA.-1981.-649.-P.98-104.
210. Naccache P., Feinstein M.B. Effect of pCMBS on water transfer across biological membranes//J.Gen.Physiol.-1974.-84.-P.449-456.
211. Leo A., Hanch C., Elkins D. Partition coefficients and their uses//Chem.Rev.-1971.-71.-P.525-616.
212. Хилле Б. Ионная селективность Na^+ и K^+ -каналов в мембранах нервного волокна//Мембраны: ионные каналы: Пер. с англ.-М.: Мир, 1981.- С.25-97.
213. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт.-М.:Мир,1980.-342 с.
214. Leibo S.P. Freezing damage of bovine erythrocytes: simulation using glycerol concentration changes at subzero temperatures//Cryobiology.-1976.-13,5.-P587-598.
215. Mazur P., Leibo S.P., Miller R.H. Permeability of the bovine red cell to glycerol in hypertonic solutions at various temperatures//J.Membr.Biol.-1974.-15.-P.107-136.
216. Пушкарь Н.С., Белоус А.М. Введение в криобиологию.- Киев:Наук.думка, 1975.-344 с.
217. Zou C.G., Agar N.S., Jines G.L. Haemolysis of human and sheep red blood cells in glycerol media: the effect of pH and role of band 3// Comp.Biochem.Physiol.A Mol.Integr.Physiol.-2000.-127, 3.-P.347-353.
218. Гордієнко О.І. Фізико-математична модель дифузії малих електронейтральних молекул крізь білкові мембранні пори//Фізика живого.-2002.-10, 2.-С.88-94.

219. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів//Вісник ХНУ.-№568.-2002.- Біофіз.вісник.-2(11).-С.43-47.
220. Автомян Е.Г., Коший С.В., Федотова Т.Н. Исследование водородных связей в алкиловых эфирах глицерина//Ж.прикл.спектроск.-1988.-48,2.- С.287-290.
221. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Алексеева Л.І., Коваленко І.Ф. Оцінка стану популяції еритроцитів людини по їх розподілу за індексом сферичності//Доповіді НАНУ.-2002.-10.-С. 172-177.
222. Маршелл Э. Биофизическая химия: В 2 т.: Пер. с англ/М.: Мир, 1981.- т.1.-360 с.
223. Василевская Н.Л. Методика определения резистентности эритроцитов//Бюл. эксп. биол.-1955.-№12.-С.68-72.
224. Вопросы биофизики, биохимии и патологии эритроцитов/Под ред. Г.М.Франка , В.Т. Поэтова-М.: Наука, 1967.-352 с.
225. Стусь Л.К., Лоевский М.М., Липина О.В., Гордиенко О.И. Куракса В.М. Функциональная неравнозначность эритроцитов донорской крови в связи с их различной кислотной резистентностью//Гематол. и трансфузиол.-1988.-№2.-С.49-52.
226. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф. та ін. Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності//Вісн.Харк.ун-ту.-2000.-N488.-Біофіз.вісн.-Вип.6.-С.75-78.
227. Bull B.S. The resting shape of the normal red blood cell is determined by bonding//Blood cells.-1977.-3.-P.721-728.
228. Canham P.B. The minimum energy of bending as a possible expnation of the human red blood cell//J.Theor.Biol.-1970.-37.-P.61-72.
229. Helfroth W., Dueling H.J. Some theoretical shapes of red blood cells// J.Phys. (Paris) Collog.-1975.-36.-P.1-5.

230. Anderson P.C., Lovrien R.E. Human red cells hemolysis rates in the subsecond to seconds range. *Analysis//J.Biophys.*-1977.-20.-P.181-191.
231. Гордиенко Е.А. Анализ и численное моделирование трансмембранного переноса молекул воды, криопротектора и перераспределение мембранных компонентов вдоль бислоев при низкотемпературном консервировании клеточных суспензий//Дис...докт. биол. наук: 03.00.02.-Харьков, 1989.-262 с.
232. Svetina S., Zeks B. Bilayer couplen hypothesis of red cell shape transformations and osmotic hemolysis//*Biochem.Biophys. Acta.*-1983.-11-12, N42.- P.86-90.
233. Яковенко Е.Е., Розенберг Ю.М., Колодей С.В. и др. Анализ фильтруемости неоднородных суспензий эритроцитов//*Биол. мембраны.*-2001.- 18.-С.16-28.
234. Eskelinen S., Coacley W.T. Microscopic observation and video recording of cellular response to sudden changes in environment//*J.of Microscopy.*-1986.-141.-P.119-126.
235. Рачев Р.Р., Ещенко Н.Д. Тиреоидные гормоны и субклеточные структуры.-М.: Медицина, 1979.-240 с.
236. Болезни щитовидной железы/Под ред.Л.И. Бравермана.-М.: Медицина, 2000.-432 с.
237. Роль липидов в метаболическом эффекте гормонов/Под ред.А.Н. Николаева.-Ташкент: ФАН, 1990.-194 с.
238. Кравцов А.В., Алексеенко О.Р. Механизмы регуляции векторов ферментов биомембран.-Киев: Наукова думка, 1990.-176 с.
239. Lo C.S., Klein L.E., Lo N.N. Effect of thyroid hormone on carbohydate of $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ -adenosine triphosphatase//*Amer.J.Physiol.*-1984.-247,3.-P.282-287.
240. Smith T.J., Davis F.B., Davis P.J. Stereochemical requirements for the modulation by retionic acid of thyroid hormone activation of Ca^{2+} -ATPase and binding of the human erythricyte membrane//*Biochem.J.*-1992.-284.-P.583-587.

241. Dube M.P. Davis F.B., Davis P.J. et al. Effects of hyperthyroidism and hypothyroidism on human red blood cell Ca^{2+} -ATPase activity//J.Clin.Endocrin.Metab.-1986.-63.-P.253-257.
242. Fanjul A.N., Farias R.N. Cold-sensitive cytosolic 3,5,3'-triido-L-thyronine-binding protein and pyruvate kinase from human erythrocytes share similar regulatory properties of hormone binding by glycolytic intermediates//Biol.chem.-1993.-268.-P.175-179.
243. Baskurt O.K. et al. In vitro effects of thyroxine on mechanical properties of erythrocytes//Life Sci.-1990.-46.-P.1471-1477.
244. Веренинов А.А., Марахова И.И. Транспорт ионов у клеток в культуре.- Л.: Наука.-1986.-291 с.
245. Aloni B., Eitan A., Livne A. The erythrocyte membrane site for effect of temperature on osmotic fragility//Biochem.Biophys.Acta.-1977.-465.-P.46-53.
246. Livne A., Raz A. Erythrocyte fragility and potassium efflux as affected by temperature and hemolysing rate//FEBS Letter.-1971.-16.-P.99-101.
247. Murphy J.R. Erythrocyte osmotic fragility and cell water-influence of pH and temperature//J.Lab.Clin.Med..-1969.-74.-P.319-324.
248. Waugh R., Evans E.A. Temperature dependence of the elastic moduli of red blood cell membrane//Biophys .J.-1979.-26.-P.115-132.
249. Seeman P. et al. The effect of membrane-strain rate and temperature on erythrocytes fragility and critical hemolytic volume//Biochem.Biophys. Acta.-1969.- 183.-P.476-489.
250. Nishihara Y., Utsumi K. Diminished osmotic fragility and shape alterations of human erythrocytes following the treatment with 1,1,1-trichloro-2,2-bis ethane (DDT)//Cell.Mol.iol.-1983.-29.-P.103-111.
251. Richiery G.V., Mel H.C. Temperature effects on osmotic fragility and erythrocyte membrane//Biochem.Biophys.Acta.-1985.-813.-P.41-50.

252. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О. Джерело ентропії і рівняння руху багатокомпонентного розчину// Вісник ХНУ.-2003.-№593.-Біофіз. вісник.-вип.1(12).-с.74-78.
253. Гордієнко О.І. Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є. Фізико-математична модель та експериментальне визначення явища гіпотонічного гемолізу//Доповіді НАНУ.-1998.-11.-с.173-176.
254. Гордиенко О.И., Панина Ю.Е., Коваленко И.Ф. Определение коэффициентов проницаемости мембран эритроцитов для криопротекторов//Вісник Харк. ун-ту.- 1998. -422. -Біофіз. вісник, вип.2.-С.59-63.
255. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Проникність мембран еритроцитів людини до неелектролітів низки амідів//Вісник ХНУ.-2003.-№593.-Біофіз. вісник.-вип.1(12).-с.92-96.
256. Гордієнко О.І. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів до 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду//Пробл.криобиол.-2003.-1.-с. 38-45.
257. Hermann J., Hetzinger S. Diagnosis of hereditary spherocytosis//Folia Haematol Int Mag Klin Morphol Blutforsch.-1989.-116, 5.-P.769-773.
258. Yamaguchi T., Terada S., Ideguchi H. High-pressure-induced hemolysis of hereditary spherocytic erythrocytes is not suppressed by DIDS labeling//Jpn J Physiol.-1997.-47, 6.-P.571-574.
259. Iglauer A., Reinhardt D., Schroter W., Pekrun A. Cryohemolysis test as a diagnostic tool for hereditary spherocytosis//Ann Hematol.-1999.-78, 12.-P.555-557.
260. Bricteux G., Panagopoulos A., Paulus J.M. Hyperdense red blood cells and spherocytosis//Rev Med Liege.- 2002.-57, 7.-P.443-448.
261. Apel D., Marianska B., Maj S. Diagnostic value of acidified glycerol lysis test (AGLT) in hereditary spherocytosis and selected hematologic diseases//Acta Haematol Pol.-1993.-24, 3.-P.267-271.

262. Streichman S., Gescheidt Y. Cryohemolysis for the detection of hereditary spherocytosis: correlation studies with osmotic fragility and autohemolysis//Am J Hematol. 1998.-58, 3.-P.206-12.
263. Gregor P., Hromec A., Jakubovsky J. et al. The spleen in hereditary spherocytosis//Cesk Patol.-1996.-32, 1.-P.7-11.
264. Reliene R., Mariani M., Zanella A. et al. Splenectomy prolongs in vivo survival of erythrocytes differently in spectrin/ankyrin- and band 3-deficient hereditary spherocytosis//Blood.-2002.-100, 6.-P.2208-2215.
265. Suda T., Akamatsu A., Nakaya Y. et al. Alterations in erythrocyte membrane lipid and its fragility in a patient with familial lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency// J Med Invest.-2002.-49, 3-4.-P.147-155.
266. Zanella A., Izzo C., Rebulla P. et al. Acidified glycerol lysis test: a screening test for spherocytosis//Br J Haematol.-1980.-45, 3.-P.481-486.
267. Rutherford C.J., Postlewaite B.F., Hallows M. An evaluation of the acidified glycerol lysis test//Br J Haematol.-1986.-63, 1.-P.119-121.
268. Reinhardt D., Witt O., Miosge N. et al. Increase in band 3 density and aggregation in hereditary spherocytosis//Blood Cells Mol Dis.-2001.-27, 2.-P.399-406.
269. Bolton-Maggs P.H. The diagnosis and management of hereditary spherocytosis//Baillieres Best Pract Res Clin Haematol.-2000.-13, 3.-P.327-342.
270. Bruce L.J., Ghosh S., King M.J. et al. Absence of CD47 in protein 4.2-deficient hereditary spherocytosis in man: an interaction between the Rh complex and the band 3 complex//Blood.-2002.-100, 5.-P.1878-1885.