

ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМ. В.Н.КАРАЗІНА

ГОРДІЄНКО ОЛЬГА ІВАНІВНА

УДК: 577.35

**МЕХАНІЗМИ ПАСИВНОЇ ПРОНИКНОСТІ ДО НЕЕЛЕКТРОЛІТІВ ТА ІНДЕКС
СФЕРИЧНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ЛЮДИНИ**

03.00.02-біофізика

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
доктора фізико-математичних наук

Харків - 2005

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана в Інституті проблем кріобіології і кріомедицини НАН України.

Офіційні опоненти:

доктор фізико-математичних наук, професор

Курик Михайло Васильович, Інститут фізики НАН України, завідувач відділу (м. Київ);

доктор фізико-математичних наук, професор

Покровський Валерій Олександрович, Інститут хімії поверхні НАН України, заступник директора з наукової роботи (м. Київ);

доктор фізико-математичних наук, професор

Мартиненко Олександр Віталійович, Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, завідувач кафедри (м. Харків).

Провідна установа

Київський національний університет ім. Тараса Шевченка, кафедра біофізики (м. Київ).

Захист відбудеться “18” березня 2005 року о 15-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д64.051.13 у Харківському національному університеті ім. В.Н. Каразіна за адресою: 61077, м. Харків, пл. Свободи, 4, ауд. 7-4.

З дисертацією можна ознайомитись у Центральній науковій бібліотеці Харківського національного університету ім. В.Н. Каразіна за адресою: 61077, м. Харків, пл. Свободи, 4.

Автореферат розісланий “14” лютого 2005 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради

Гаташ С.В.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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.

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 (1958). Виходячи з фундаментальних принципів термодинаміки необоротних процесів у 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 (Paganelli C.V., Solomon A.K., 1957; Sha'afi R.I. et al., 1970; Wessels J.M.C., Pals D.T.F., 1973; Solomon A.K. et al., 1986; Toon M.R., Solomon A.K., 1996). 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 (Mazur P., Miller R.H., 1976) 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 (Paganelli C.V., Solomon A.K., 1957; Solomon A.K. et al., 1986; Toon M.R., Solomon A.K., 1996). 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. В роботі Macey R.I., Karan D.M. (1993) ці методи 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 (Garrick R.A., 1983). 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). Чисельну величину проникності D отримують з експериментально визначених D_1 і D_2 . 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 (Mazur P., Miller R.H. (1976) 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 об'єму. Було показано (Saari J.T., Beck J.S., 1974), 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 (Козлов М.М., Маркин В.С., 1984). Крім того, у світлі уявлень, висунутих в роботах (Козлов М.М., Маркин В.С., 1984; Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., 1986; Гордиенко Е.А., Пушкарь Н.С., 1994), 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. (1984) і нами (Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., 1986), 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. 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. Неоднорідність популяції еритроцитів не є випадковою, а характеризує стан системи крові в цілому (Леонова В.Г., 1987). 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 (Rand R.P.,

Burton A.C., 1963; Waugh R.E. et al., 1992). Раніше індекс сферичності в популяції еритроцитів вимірювали шляхом фотографування окремих клітин і розрахунку цього геометричного параметра за профілем їх збільшеного фотографічного зображення (Jay A.W., 1975). 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 (Шайтан К.В. и др., 2002). 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 в розвитку кріопшкоджень і кріозахисту біологічних об'єктів. Оптимізація етапів технологічного процесу кріоконсервування клітин і тканин” (1986-1990 рр.), № держреєстрації 01870065544; “Вивчення механізмів кріопшкодження і кріозахисту біооб'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 ВМББЕіКФ Президії НАН України від 14.01.1996 р. “Побудова та експериментальна перевірка кількісної теорії кріоконсервування біооб'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. Мета роботи полягала в розробці нових методів визначення коефіцієнтів пасивної проникності та розподілу за індексом сферичності еритроцитів людини і з'ясуванні механізмів проникності мембран еритроцитів для неелектролітів та розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяціях різних донорів.

Для досягнення поставленої мети вирішувались наступні **задачі** :

- на підставі фундаментальних уявлень теорії необоротних процесів, з урахуванням рівнянь руху окремих компонентів отримати вираз для джерела ентропії та зв'язок коефіцієнтів

тертя із загальноновживаними параметрами трансмембранного масопереносу;

- 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;
- 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.
- 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);
- теоретично розглянути вплив геометричних та фізико-хімічних параметрів молекул на особливості їх проникання крізь водні білкові пори сталого розміру;
- дослідити вплив температури на пасивну проникність мембран еритроцитів для неелектролітів;
- 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;
- 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'єктом дослідження є механізми трансмембранного масопереносу в еритроцитах людини, розкид біофізичних параметрів клітин в популяції, вплив температури на структурно-функціональний стан мембран еритроцитів.

Предметом дослідження є розробка методів визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для електрично нейтральних речовин та щільності розподілу еритроцитів в 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 включають 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, теорію Мі розсіювання світла сферичними

однорідними частинками в наближенні аномальної дифракції. Коефіцієнти пасивної проникності мембран еритроцитів до електронейтральних 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.

1. 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.

2. 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.

3. На підставі розробленої теорії створено новий удосконалений метод визначення коефіцієнтів пасивної проникності мембран еритроцитів для електронейтральних речовин, який спирається на аналітичні, а не на чисельні, рішення системи диференціальних рівнянь, що описують процеси трансмембранного масопереносу.

4. Розробленим експериментальним методом та теоретично досліджено механізми проникання малих електронейтральних 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 досліджені температурні залежності проникності еритроцитів для неелектролітів, які надали можливість встановити зв'язки між термоіндукованими процесами в мембранах та їх пасивною проникністю.

5. На підставі фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу в розчині непроникаючої речовини розроблено оригінальний метод визначення щільності розподілу еритроцитів в популяції за індексом сферичності.

6. 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 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 вибракувати непридатні для низькотемпературного консервування зразки, що може забезпечити суттєвий економічний ефект.

Особистий внесок здобувача полягає в розробці методів, ініціюванні та здійсненні усієї представленої серії досліджень проникності мембран еритроцитів до низки електронейтральних речовин та розподілу еритроцитів за індексом сферичності.

В опублікованих із співавторами працях особистий внесок здобувача полягає:

- у роботах [1,3,10-12,17,22,24,27,29,40] – у побудові фізико-математичних моделей процесів тепломасопереносу, аналізі теоретичних результатів, їх порівнянні з експериментальними даними, участі в експериментах;
- у роботах [2,4-6,8,13-16,20,33,34,37,41-44] – у ідеї та плануванні експериментів, участі в експериментальних вимірюваннях, аналізі результатів;
- у роботах [7,9,] – у ідеї та створенні установки для мікроскопічного визначення об'єму клітин, закріплених в полі зору мікроскопа на мікропіпетках, участь в експериментах та аналізі результатів;
- у роботах [18,21,25,28,45-48] – у ідеї, плануванні та виконанні експериментів, узагальненні експериментальних даних;
- у роботах [30,31] – в участі у теоретичній та практичній розробці методів визначення проникності та розподілу за індексом сферичності еритроцитів;
- у роботах [32,35,36,38] – у аналізі літератури та власних теоретичних моделей фізико-хімічних процесів, що протікають при кріоконсервуванні клітинних суспензій.

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.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 277 сторінках друкованого тексту і складається зі вступу, 6 розділів, підсумку, висновків і списку використаної літератури, що включає 270 джерел. Робота містить 70 рисунків та 11 таблиць, з яких 2 таблиці та 20 рисунків на окремих сторінках.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У **ВСТУПІ** обґрунтована актуальність обраної теми, сформульовані мета та задачі дослідження, визначенні наукова новизна і практична цінність одержаних результатів.

У **РОЗДІЛІ 1** подано літературний огляд, який охоплює аналіз теоретичних та експериментальних досліджень, що стосуються методів визначення проникності біологічних мембран, впливу складу штучних та біологічних мембран і температури на їх проникність для води та неелектролітів; геометричних параметрів еритроцитів, їх визначення та значення для функціональних властивостей цих клітин.

РОЗДІЛ 2 дисертації присвячений характеристиці об’єктів та методів дослідження. 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 у пологових відділеннях Харківських клінік. Як консервант 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-моноетиловий 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 (Кошій С.В., 1992). Всі інші речовини були марки “х.ч.” або “ч.д.а.”, додатково очищені у відділі кріопротекторів ІПКіК

НАНУ. 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 Macey R.L., Farmer R.E.L. (1970), тобто інкубацією з 2 мМ pCMBS впродовж 1 години при 22°C. Після інкубації еритроцити відмивали фосфатним буфером pH 7,4.

В теоретичній частині роботи використовували фундаментальні принципи термодинаміки необоротних процесів (Дьярмати И., 1974; де Гроот С., Мазур П., 1964), теорії пружності тонких оболонок при кінцевих деформаціях (Ивенс И., Скейлак Р., 1982), теорії випадкових процесів (Ланда П.С., 1980) і гідродинаміки (за малих чисел Рейнольдса) (Хаппель Дж., Бреннер Г., 1976), метод асимптотичного інтегрування системи сингулярних рівнянь з малим параметром (Марри Дж., 1983), теорію Мі розсіювання світла сферичними однорідними частинками в наближенні аномальної дифракції (ван де Хюлст Г., 1961; Борен К., Хафман Д., 1986).

Статистичну обробку результатів досліджень проводили за методом Фішера-Стьюдента з використанням *t*-критерію та кореляційного аналізу (Дьяконов В.П., 1987).

Основні експериментальні результати були отримані методом малокутового розсіювання світла суспензією еритроцитів. З теоретичних міркувань випливає, що вимірювання за принципом розсіювання світла є найбільш ефективними в разі, коли розмір частинок має порядок довжини хвилі. В цьому випадку головний внесок в екстинцію надає розсіювання, а не поглинання. Індикатриса розсіювання складається з низки пелюсток, які є симетричними відносно оптичної осі і зменшуються за інтенсивністю при збільшенні кута дифракції. Індикатриса розсіювання світла суспензією еритроцитів має два максимуми при малих кутах (3° і 9°). 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.

В роботі показано, що інтенсивність світла, розсіяного еритроцитом під кутом 9° до напрямку падаючого пучка, є рівною:

$$J = J\left(\frac{\pi}{20}\right) = Cy \left\{ \frac{1}{\left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y - \alpha}\right)\right]} \left[1 + \frac{\pi^2 (n^{\text{out}})^2}{4 \left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y - \alpha}\right)\right]^2} \right] \right\} x$$

$$\begin{aligned}
& \times J_{3/2}^2 \left(\frac{0,2\pi \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} \left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y-\alpha} \right) \right]}{\lambda \left[1 + \frac{\pi^2 (n^{out})^2}{4 \left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y-\alpha} \right) \right]^2} \right]^{1/2}} \right) + \\
& \frac{6,4 \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} \left[1 - \exp\left(-\frac{9\alpha}{y-\alpha} \right) \right]^4}{\lambda \pi^4 (n^{out})^4} \left[J_2 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \right) \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} - \right. \\
& - \frac{1}{1 \cdot 3} \xi J_3 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} \right) + \frac{1}{1 \cdot 3 \cdot 5} \xi^2 J_4 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} \right) - \\
& - \frac{1}{1 \cdot 3 \cdot 5 \cdot 7} \xi^3 J_5 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} \right) + \frac{1}{1 \cdot 3 \cdot 5 \cdot 7 \cdot 9} \xi^4 J_6 \left(\frac{0,1\pi^2 n^{out}}{\lambda} \left(\frac{3V_0 y}{4\pi} \right)^{1/3} \right) - \dots \left. \right]^2 \} \\
& \text{де } C = \frac{15}{2} \pi \frac{V_0}{\lambda r^2} I_0
\end{aligned}$$

Знаючи залежність зміни відносного об'єму сфероцита y і вмісту гемоглобіну в клітині α від часу при $y \geq y_s$ за допомогою поданої залежності легко отримати залежність інтенсивності розсіяного під кутом $\pi/20$ до напрямку падаючого пучка світла з довжиною хвилі $\lambda_c = 1$ мкм від часу.

В експериментах по визначенню коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів 3 мл водного розчину досліджуваної речовини вміщується в кювету. Після реєстрації нульової лінії в розчин вносяться еритроцити (від 0,003 до 0,01 мл в залежності від концентрації клітин у зразку) і записується кінетична крива гіпотонічного гемолізу в розчині проникаючої речовини. Коефіцієнти проникності автоматично розраховуються на ЕОМ за алгоритмом, отриманим на підставі розробленої нами фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу у водному розчині проникаючої речовини.

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

У РОЗДІЛІ 3 подано теоретичний аналіз процесів пасивного трансмембранного переносу.

Отримано вираз для питомого потоку ентропії

$$\vec{J}_s = \vec{J}_q - \sum_k \mu_k \vec{J}_k,$$

а також для джерела ентропії багатокомпонентного розчину з урахуванням рівнянь руху окремих його компонентів, що до цього часу не було зроблено.

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

де h_k – парціальна питома ентальпія k -го компоненту, $\tilde{\Pi}_k$ – кондуктивний потік імпульсу (тензор другого рангу), $\vec{J}_k = \rho_k (\vec{v}_k - \vec{v})$ – так званий дифузійний потік k -ї речовини, ψ_k – скалярний потенціал зовнішнього поля, віднесений до одиниці маси k -го компоненту, μ_k – хімічний потенціал k -го компоненту.

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 Дьярматі І. (1974). Наведена формула практично збігається з формулою, яку зазвичай 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 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'єктів рідини.

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

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

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, тобто

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

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

Рівності

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

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 трьохкомпонентного розчину отримуємо

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

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} .

За визначенням коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани, коефіцієнт проникності та коефіцієнт відбиття клітинної мембрани для s-ої речовини є

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

Отримуємо вирази для транспортних коефіцієнтів мембрани через коефіцієнти тертя, а саме

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

Для високо селективних мембран, якими є клітинні мембрани

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

Тому

$$\omega_s \approx \frac{1}{h} \frac{K_s}{f_{sm}}, \quad L_p \approx \frac{1}{h} \frac{c_w v_w^2}{f_{wm}}, \quad \sigma_s = 1 - \frac{v_s K_s f_{wm}}{c_w v_w^2 (f_{sm} + f_{sw})}$$

$$\text{для пори } \sigma_s = 1 - \frac{v_s f_{wm}}{v_w f_{sm}}, \text{ оскільки } f_{sm} \gg f_{sw}, \quad c_w v_w \ll 1 \quad \text{і} \quad K_s = 1$$

Отримані вирази подібні до класичних виразів, отриманих в роботі Kedem, Katchalsky (1961). Але, наш результат 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 в за більш загальних припущень.

РОЗДІЛ 4 присвячений побудові фізико-математичної моделі гіпотонічного гемолізу еритроцитів. Зміна об'єму клітини і внутрішньоклітинної концентрації проникаючої в клітину речовини описується системою звичайних диференціальних рівнянь, яка при переході до безрозмірних величин має вигляд:

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

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

$$\text{де} \quad \Delta \hat{\pi}_s = \frac{\Delta \pi_s}{\pi_0}, \quad \frac{1}{\tau_0} \equiv \mathcal{L}_p \pi_0, \quad \frac{1}{\tau_1} \equiv \mathcal{K},$$

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

Відомо (Ивенс И., Скейлак Р., 1982), що розрив мембрани еритроцита виникає при невеликій відносній зміні площі поверхні його мембрани, відповідно, при невеликій зміні 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

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

Точне аналітичне рішення системи наведених нелінійних рівнянь, що описують процеси масопереносу в системі з одною проникаючою речовиною в позаклітинному середовищі, відсутні. 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 зручно для аналізу рішення системи рівнянь за допомогою асимптотичних методів рішення сингулярно збурених систем (Марри Дж., 1983). Для цього подамо систему рівнянь у вигляді

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

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

де введено безрозмірний “повільний” час $t^* = \frac{t}{\tau_1}$ і нову змінну $z' = (y - \alpha) \hat{\pi}_s^{in}$ і

$\hat{\pi}' = \pi' / \pi_0$, де π' - осмотичний тиск позаклітинного розчину, $\Delta\hat{\pi}_p^{in} = \pi_p^{in} / \pi_0$ - 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 для часів $\tau_0 \ll t \approx 10^{-2}$ с за допомогою згаданого вище методу сингулярних збурень. Час досягнення клітиною сферичного об'єму y_s визначається як

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

Зміна відносного об'єму клітини за $y > y_s$ в несингулярній області описується рішенням

$$t^* - t_s = 2(y - y_s) - \frac{2C'(y_s - \alpha) + 3\sigma_s \hat{n}'}{4C'} \times \ln \left\{ 1 - \frac{2C'}{3(1 - \alpha)} \left[(y - \alpha)^2 - (y_s - \alpha)(y - \alpha) \right] \right\} +$$

$$+ \frac{2C'(y_s - \alpha)^2 + 3\sigma_s \hat{n}'(y_s - \alpha) + 12(1 - \alpha)}{4\sqrt{C'}\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)}} \times \ln \left\{ \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} + 2\sqrt{C'}(y - y_s / 2 - \alpha / 2)}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} - 2\sqrt{C'}(y - y_s / 2 - \alpha / 2)} \times \right.$$

$$\left. \frac{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} - \sqrt{C'}(y_s - \alpha)}{\sqrt{C'(y_s - \alpha)^2 + 6(1 - \alpha)} + \sqrt{C'}(y_s - \alpha)} \right\}$$

В несингулярній області, тобто за часів, що перевищують τ_0 , ці рішення з точністю до членів порядку $O(\varepsilon)$ апроксимують точне рішення вихідної системи рівнянь.

В роботі (Козлов М.М., Маркин В.С., 1984) і в нашій роботі (Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., 1986) побудована теорія осмотичного лізису ліпідних везикул, що виникає внаслідок флуктуаційного утворення макроскопічної пори в ізотропно розтягнутому мембранному бішарі. Середній час, за який утворюється макроскопічна пора в ізотропно розтягнутій мембрані еритроцита,

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

є тим більшим, чим менше розтяг мембрани і чим нижча температура, при якій утворюється пора. 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 не вигідним (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. З урахуванням часу, за який в мембрані клітини, зануреної в гіпертонічний розчин проникаючої речовини, утворюється макроскопічна пора були отримані вирази, які повністю визначають зміну відносного об'єму еритроцита з часом на i -ому етапі гемолізу

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

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

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

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.

Як витікає з наведених в цьому розділі роботи теоретичних результатів, розвинені в них уявлення про фізичний механізм гіпотонічного гемолізу пояснюють основні закономірності цього явища, що відомі з літератури. Наша 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. У сукупності з рішенням для інтенсивності розсіяного суспензією сферичних часток світла отримані співвідношення є підставою для експериментального визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для електрично нейтральних речовин методом 50%-го гемолізу з урахуванням часу гемолізу згідно з описаним механізмом.

У **РОЗДІЛІ 5** розроблений метод застосовується для експериментального визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів людини. Вивчали проникність мембран еритроцитів людини до неелектролітів низок діолів та амідів, гліцерину і його ефірних похідних.

Напрямок наших досліджень був обумовлений 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. Коефіцієнти проникності (P) нативних еритроцитів та еритроцитів, проінкубованих з рСМBS, для речовин низки діолів в залежності від коефіцієнта розподілу між водою та гідрофобною фазою (K_p) представлені на рис.1. З рисунка видно, що проникання всіх представлених діолів пригнічується обробкою еритроцитів сульфгідрильним реагентом. Це свідчить про існування білкового шляху проникання цих речовин, який блокується рСМBS. В той же час, проникність для бутандіолів навіть для нативних еритроцитів має пряму залежність від коефіцієнтів розподілу між гідрофобною та гідрофільною фазою (коефіцієнт кореляції становить 0,927). Ці дані свідчать про те, що проникання бутандіолів здійснюється значною мірою крізь ліпідну фазу. Коефіцієнт кореляції між коефіцієнтами проникності до ізомерів бутандіолу для еритроцитів, проінкубованих з рСМBS, і коефіцієнтами розподілу є ще більшим і становить 0,996 (графік 2 на рис 1).

Аналіз даних для групи гідрофільних речовин (етиленгліколь, 1,2-пропандіол, 1,3-пропандіол) (ліва гілка кривої 1 на рис.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 пори є більш прийнятним, і тому зрозумілим стає така сильна залежність від розмірів молекули. 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, а після інкубації з рСМBS вони відрізняються лише в 1,3 рази.

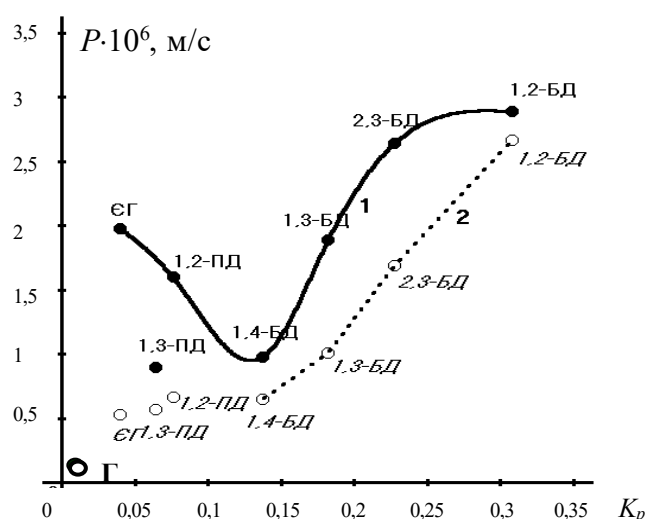


Рис.1. Залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для молекул діолів та гліцерину від коефіцієнта розподілу цих речовин в системі "н-октанол÷вода" ● - нативні еритроцити, ○ - проінкубовані з рСМBS

Інкубація еритроцитів з сульфгідрильним реагентом пригнічує проникність 1,2-пропандіолу на 58%, а 1,3-пропандіолу лише на 36,3%. Це означає, що різниця в розмірах молекул цих ізомерів приводить до значного зменшення проникності 1,3-пропандіолу по водних каналах. Таким чином, перехід від діаметра 3,7 Å для 1,2-пропандіолу до діаметра 4,1 Å для 1,3-пропандіолу є критичним для проходження крізь пору. Висновок про важливість розмірів молекул для проникання білковими каналами підтверджується також даними для ізомерів бутандіолу. Відсоток пригнічення проникності після обробки сульфгідрильним реагентом різко зменшується для 1,2-бутандіолу (діаметр молекули 4,3 Å) і становить лише 7,6% в порівнянні з іншими ізомерами бутандіолу, для яких він становить 34-47% (діаметри молекул є 3,6 Å, 3,9 Å та 4,0 Å для 1,3-, 2,3- та 1,4-бутандіолу відповідно).

Вплив розмірів молекул на їх проникання крізь мембрани добре ілюструється порівнянням коефіцієнтів проникності в низці: етиленгліколь-діетиленгліколь-триетиленгліколь. Так, коефіцієнт проникності суттєво зменшується від етиленгліколю ($P=1,98 \cdot 10^{-6}$ м/с, $D=2,6$ Å) до діетиленгліколю ($P=0,421 \cdot 10^{-6}$ м/с, $D=4,1$ Å). Обробка еритроцитів рСМБС різко зменшує проникність для етиленгліколю (на 77%), тобто можна сказати, що етиленгліколь проникає крізь мембрану еритроцита в основному крізь водні пори. Для діетиленгліколю, діаметр молекули якого співпадає з діаметром 1,3-пропандіолу (4,1 Å) пригнічення проникності становить лише 35,6 % і є таким же, як для 1,3-пропандіолу (36,3%). Що ж до триетиленгліколю, то він має коефіцієнт проникності більш ніж на порядок нижчий, ніж етиленгліколь ($P=0,162 \cdot 10^{-6}$ м/с), а обробка еритроцитів сульфгідрильним реагентом майже не впливає на його величину. Тобто можна з впевненістю сказати, що молекули триетиленгліколю не проникають крізь водні пори. Коефіцієнти кореляції між коефіцієнтами проникності нативних еритроцитів та розмірами молекул в 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 рСМБС, вони становлять -0,5 для діаметра і -0,927 для об'єму. Тобто, якщо для проходження молекул крізь пори 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 коефіцієнта кореляції (0,94) між коефіцієнтом проникності рСМБС оброблених еритроцитів для етиленгліколю і 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.

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

сульфгідрильним реагентом. Результати представлені на рис.2. 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.2, крива 1), що, як і у випадку діолів, пов'язано з розмірами молекули ($D=4,2 \text{ \AA}$). 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.2, крива 2), коефіцієнт кореляції становить 0,94. 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%. Коефіцієнт кореляції між відсотком пригнічення проникності амідів та діаметром їх молекул становить $-0,87$.

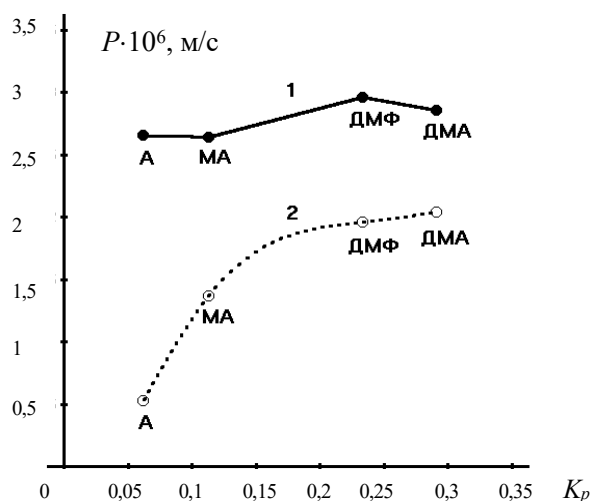


Рис. 2. Залежність коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для молекул амідів від коефіцієнта розподілу цих речовин в системі “октанол-вода” ● - нативні еритроцити, ○ - проінкубовані з рСМБС

Проникання молекул крізь білкові гідрофільні пори розглянуто нами теоретично на підставі простих фізичних та геометричних міркувань. В таблиці 1 представлено результати вимірювання ефективних коефіцієнтів проникності мембран нативних еритроцитів людини $P = (S_n/S)K_n + (S_l/S)K_l$ (S - площа поверхні мембрани) для діолів та амідів при температурі 20°C , а також

еритроцитів, проінкубованих з ртутним сульфгідрильним реагентом рСМBS, тобто крізь ліпідний бішар $P_L = (S_L/S)K_L$. Оскільки сумарна площа S_n , яку займають водні пори, за даними літератури (Solomon, 1983) є набагато меншою порівняно з площею S_L , яку займають ліпіди, можна з великою точністю вважати $P_L = (S_L/S)K_L \cong K_L$. З отриманих експериментальних даних були визначені величини $P_n = (S_n/S)K_n$, які характеризують трансмембранну дифузію безпосередньо крізь водні пори (табл.1, 4 шпальта). Із урахуванням гідратації ефективний діаметр d_e і ефективна довжина l_e молекули стає рівною $d_e = d + 2h$ і $l_e = l + 2h$. 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, тобто, коли її вісь відхиляється від осі пори на кут, що не перевищує деяке визначене значення θ_m . Ймовірність W_n того, що молекули, які орієнтовані в інтервалах кутів, що визначаються нерівностями $0 \leq \theta \leq \theta_m$, $\pi - \theta_m \leq \theta \leq \pi$, здатні пройти крізь мембранну пору, є:

$$W_n = 1 - \frac{l_e \sqrt{l_e^2 + d_e^2 - a^2}}{l_e^2 + d_e^2 - a d_e}$$

При наявності геометричних обмежень $P_n = P_n^A (D/D_A) W_n$, де D – коефіцієнт дифузії досліджуваної речовини в порі, D_A – коефіцієнт дифузії молекули, яка дифундує крізь пору без геометричних обмежень. Оскільки, як відомо (Котык А., Яначек К., 1980), в розчині $D \sim M^{-1/2}$, де M – молекулярна маса речовини, що дифундує, то $P_n = P_n^A (M_A/M)^{1/2} W_n$. Припустимо, що $a = 12 \text{ \AA}$. При такому розмірі пор серед усіх 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 $P_n^A = 2,132 \cdot 10^{-6} \text{ мс}^{-1}$. Отже

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

За допомогою цієї рівності можна обчислити ефективний коефіцієнт P_n проникності тої чи іншої речовини крізь мембранні пори. Результати розрахунків представлені в табл.1 (остання шпальта). Цілковитим узгодження експериментальних і розрахованих значень P_n свідчить на користь адекватності побудованої нами моделі проникання невеликих електрично нейтральних молекул крізь гідрофільні мембранні пори разом з гідратною оболонкою.

Таблиця 1

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

Речовина	$P \cdot 10^6$ $\text{м} \cdot \text{с}^{-1}$	$P_d \cdot 10^6$ $\text{м} \cdot \text{с}^{-1}$	$P_n \cdot 10^6$ $\text{м} \cdot \text{с}^{-1}$	d, Å	l, Å	$\sqrt{\frac{M_A}{M}}$	h, Å	$d_e, \text{Å}$	$l_e, \text{Å}$	W_n	$P_n \cdot 10^6$ 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-бугандіол	0,979	0,646	0,333	4,0	7,4	0,810	2,0	8,0	11,4	0,177	0,306
1,3-бугандіол	1,890	1,010	0,880	3,6	6,0	0,810	2,0	7,6	10,0	0,443	0,765
2,3-бугандіол	2,640	1,690	0,950	3,9	5,8	0,810	2,0	7,9	9,8	0,415	0,716
1,2-бугандіол	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

Для подальшого вивчення цього питання ми провели дослідження проникності мембран еритроцитів людини для гліцерину та його моноалкілових ефірів. Вибір речовин обумовлювався можливістю дослідити вплив енергії водневих зв'язків молекул з водою на їх проникання крізь водні білкові пори 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 (табл.2).

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) (Leo A. et al., 1971), 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 $4,7 \text{ \AA}$). До того ж, така висока гідрофільність означає більший розмір гідратної оболонки, що збільшує ефективні розміри молекул.

Таблиця 2

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

Речовина	$P \cdot 10^6$, м/с	$P_1 \cdot 10^6$, м/с	$P_p \cdot 10^6$, м/с	h , $\text{\AA}$	$d_c =$ $d + 2h$, $\text{\AA}$	$l_c =$ $l + h$, $\text{\AA}$	$\sqrt{\frac{M_A}{M}}$	W_{π}	$P_p \cdot 10^6$ розр.
Гліцерин	0,038	0,038	0	-	-	-	-	-	-
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

Молекули ефірів гліцерину 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 цих речовин. А це означає, що вони частково проникають крізь білкові гідрофільні пори. Результати розрахунку проникання молекул моноалкілових ефірів гліцерину крізь гідрофільні пори, аналогічного проведеному для діолів та амідів, цілком задовільно узгоджуються з експериментальними даними (табл. 2). А коефіцієнт

кореляції між проникністю для моноалкілових ефірів гліцерину проінкубованих з pCMBS еритроцитів (тобто проникністю крізь ліпідний бішар) та коефіцієнтами розподілу між гідрофільною та гідрофобною фазами є достатньо високим і становить 0,97. Таким чином, у результаті проведених досліджень показано, що гліцерин не проникає крізь водні пори, 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.

Аналіз результатів дослідження впливу температури на проникність мембран еритроцитів для 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду свідчить про існування термоіндукованих змін енергії активації проникності еритроцитарних мембран при температурах 8-12°C, 18-20°C та 25-30°C для обох досліджених речовин. Зміни енергії активації для 1,2-ПД є більш вираженими, 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.3.). 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. 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 у стані мембрани.

Таблиця 3

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

Донор	1,2-ПД			ДМСО		
	Діапазон температур °C	Е _А , кДж/Моль	<Е _А > кДж/Моль	Діапазон температур °C	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 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 фосфоліпідній системі, на яку вказують в роботі (Minetti M. et al. 1984). 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 електронейтральних 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. 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 електронейтральних молекул.

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

РОЗДІЛ 6 присвячений методу визначення та дослідженню розподілу еритроцитів у популяції за індексом сферичності. 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. З простих геометричних міркувань випливає, що відносний об'єм y_s , при якому еритроцит перетворюється у сферу, визначається рівністю

$$y_s = P_0 = \frac{V_{c\phi}}{V_0} = \frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi}V_0}$$

де P_0 ми називаємо індексом сферичності еритроцита в первісному стані.

З експериментальних залежностей осмотичної крихкості (тобто залежності частки еритроцитів, що не зазнали гемолізу, від осмотичного тиску позаклітинного середовища) отримуємо функцію розподілу параметра y_s в популяції еритроцитів даного донора

$$\frac{N(y_s \leq y^*)}{N_{\text{повне}}} = \varphi(y_s)$$

Диференціюючи по y_s , отримуємо відповідні щільності розподілу параметра y_s в популяції еритроцитів відповідного донора.

Розробленим методом нами було досліджено розподіл еритроцитів за індексом сферичності в популяціях здорових дорослих донорів, людей з ендокринною патологією та в пуповинній крові людини. Показано, що розподіл еритроцитів в популяціях здорових дорослих донорів за індексом сферичності має вигляд, близький до гаусового і характеризується гладким перебігом кривої з одним максимумом (рис.3).

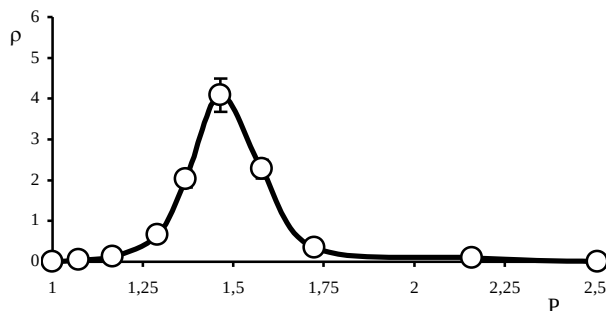


Рис. 3. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності в популяціях здорових дорослих донорів (усереднена крива)

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.

Відомо, що розподіл еритроцитів за різними характеристиками суттєво змінюється в онтогенезі людини. Результати показали, що запропонована характеристика також 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. 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. 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%).

Виявлено, що 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, і тільки 10% клітин мали індекс сферичності в діапазоні 1,73-1,9. Це добре видно на індивідуальних кривих розподілу (рис.4).

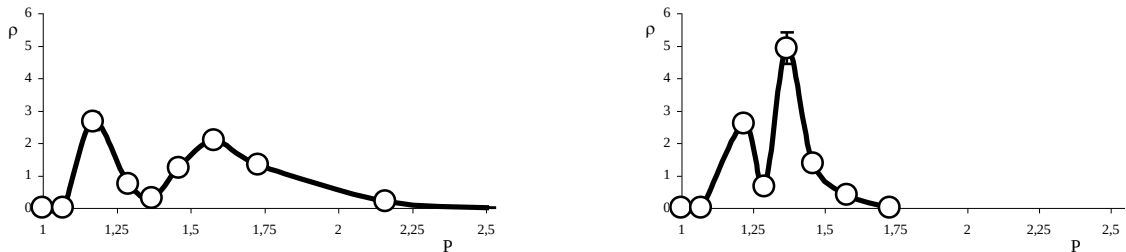


Рис.4. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворих на гіпертиреоз

У випадку гіпотиреозу криві частіше мають тримодальний вигляд (рис.5) 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.4).

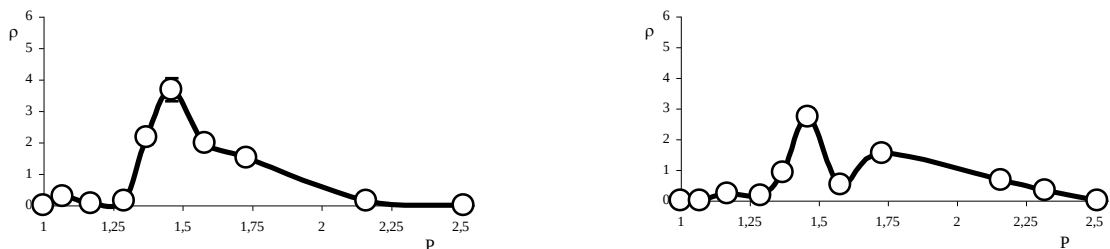


Рис. 5. Щільність розподілу еритроцитів за індексом сферичності у хворих на гіпотиреоз

До того ж індекс сферичності сплюснених клітин значно перевищує індекс сферичності молодих дискоїдних клітин в контрольних зразках (рис.4), в яких дуже незначний відсоток клітин перевищував значення 1,9.

В роботі досліджено вплив температури на розподіл еритроцитів за індексом сферичності. Розташування та зсув центру головного максимуму розподілів подано в таблиці 4. З наведених даних 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.

Таблиця 4

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

З отриманих експериментальних даних можна оцінити величину коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів в інтервалі температур від 3 до 37°C. Враховуючи, що $\Delta S = kS_0\Delta T$, де k - коефіцієнт теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцита, та з визначення індексу сферичності отримуємо

$$k = \frac{1}{\Delta T} \left[\left(1 - \frac{\Delta P}{P_0} \right)^{\frac{2}{3}} - 1 \right]$$

Підставляючи у отримане співвідношення 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 коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембрани еритроцита $k=2,4 \cdot 10^{-3}/^{\circ}\text{C}$, яке задовільно узгоджується з виміряним мікропіпетковим методом (Ивенс И., Скейлак Р., 1982).

Отже, розроблений метод визначення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності є чутливим інформативним тестом для кількісної оцінки стану популяції еритроцитів при різних патологіях, а також за дії зовнішніх чинників, наприклад, температури.

У ПІДСУМКУ узагальнені отримані теоретичні та експериментальні результати. Зроблено висновок, що проведене в роботі теоретичне дослідження процесів масопереносу крізь біологічні мембрани, побудова фізико-математичних моделей гіпотонічного гемолізу дозволили 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 тримодальним, 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 опублікованих праць за темою дисертації

1. 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.

2. 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.

3. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И. О механизме осмотического лизиса эритроцитов //Криобиология.-1986.-2.-С.23-25.

4. Гордиенко О.И., Гордиенко Е.А. Влияние температуры и состава среды на пассивную проницаемость мембран эритроцитов для ионов калия//Биол. мембраны.-1986.-3, №8.- С.869-872.

5. 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.

6. Стусь Л.К., Куракса В.М., Гордиенко О.И., Лоевский М.М. Прогнозирование степени повреждения эритроцитов при гипотермическом хранении крови по исходным

показателям эритроцитарной суспензии//Гематол. и трансфузиол.-1988.-4.-С.44-48.

7. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Смольянинова Е.И. К вопросу о механизме осмотического лизиса//Биол.мембраны.-1993.-10.-С.627-631.

8. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И., Коваленко И.Ф., Розанов Л.Ф. Экспериментальное изучение кинетики гипотонического и кислотного гемолиза эритроцитов человека методом малоуглового рассеяния// Пробл. криобиол.-1994.-1.-С.32-39.

9. Розанов Л.Ф., Смольянинова Е.И., Гордиенко О.И. К вопросу о роли мембраны и цитоматрикса в развитии криоповреждений клеток//Пробл. криобиол.-1994.-3.-С.12-18.

10. 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.

11. 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.

12. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є., Алексєєв О.О. Фізико-математичний аналіз та експериментальне визначення щільності розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові людини за індексом сферичності//Вісник Харк.ун-ту.-2000.-488.- Біофіз.вісник, вип.1(6).-С.75-78.

13. Гордієнко Є.О., Гордієнко О.І., Васильченко Л.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.Є. Проникність мембран еритроцитів донорської та пуповинної крові людини для молекул 1,2-пропандіолу і диметилсульфоксиду в діапазоні позитивних температур//Пробл. криобиол.-2001.-1.-С.25-27.

14. Грищенко В.И., Гордиенко О.И., Гончарук Е.И. Влияние перфторана на осмотическую хрупкость эритроцитов человека//Пробл.криобиол.-2001.-4.-С.12-16.

15. Гордієнко О.І., Македонська В.О., Коваленко І.Ф., Алексєєва Л.І. Щільність імовірності розподілу клітин за індексом сферичності в популяціях еритроцитів хворих на гіпо- та гіпертиреоз//Вісн.Харк.ун-ту.-2001.-528.-Біофіз.вісник, вип.2(9).-С.67-70.

16. Gordienko E.A., Gordienko O.I., Rozanov L.F. et al. The effect of nanosecond ultrawideband electromagnetic radiation on xenogeneic erythrocytes//Вопр. атомной науки и техники.- 2001.-№5.-Серия:Ядерно-физические исследования (39).-С.194-196.

17. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Алексєєва Л.І., Коваленко І.Ф. Оцінка стану популяції еритроцитів людини по їх розподілу за індексом сферичності//Доповіді НАНУ.-2002.-10.-С.172-177.

18. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Механізми проникання неелектролітів низки діолів крізь мембрани еритроцитів//Вісн.Харк.ун-ту.-2002.-568.- Біофіз.вісник, вип.2(11), С.43-47.

19. Гордієнко О.І. Фізико-математична модель дифузії малих електронейтральних молекул крізь білкові мембранні пори//Фізика живого.-2002.-2.-С.88-94.
20. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О., Ліннік Т.П., Компанієць А.М. Механізми проникання кріопротекторів крізь мембрани еритроцитів//Прбл.криобиол.-2002.-4.-С.9-15.
21. Гордієнко О.І., Ліннік Т.П. Проникність мембран еритроцитів людини до неелектролітів низки амідів//Вісн.Харк.ун-ту.-2003.-№593.-Біофіз.вісник.-вип.1(12).-С.92-96.
22. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О. Джерело ентропії і рівняння руху багатокомпонентного розчину//Вісн.Харк.ун-ту.-2003.-№593.-Біофіз. вісник.-вип.1(12).-С.74-78.
23. Гордієнко О.І. Вплив температури на проникність мембран еритроцитів до 1,2-пропандіолу та диметилсульфоксиду//Пробл.криобиол.-2003.-1.-С. 38-45.
24. 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.229-244.
25. Гордієнко О.І., Кошій С.В., Ліннік Т.П. Проникність мембран еритроцитів людини для гліцерину та його ефірних похідних// Фізика живого.-2003.-2.-С.29-37.
26. Гордієнко О.І. Оцінка коефіцієнта теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів за зсувом кривої розподілу еритроцитів за індексом сферичності//Вісн.Харк.ун-ту.-2003.-№606.-Біофіз. вісник.-вип.2(13).-С.78-81.
27. Гордієнко О.І., Гордієнко Є.О. Фізична інтерпретація коефіцієнтів пасивного масопереносу як коефіцієнтів тертя//Вісн.Харк.ун-ту.-2003.-№606.-Біофіз. вісник.-вип.2(13).-С.86-91.
28. Gordienko O.I., Linnik T.P., Gordienko E.O. Erythrocyte membrane permeability for a series of diols//Bioelectrochemistry.-2004.-62.-2.-P.115-118.
29. Gordienko O.I., Gordienko Yu.E., Makedonska V.O. Estimation of erythrocyte population state by spherical index distribution// Bioelectrochemistry.-2004.-62.-2.-P.119-122.
30. 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.
31. 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.
32. Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И. Закон Аррениуса –методологический принцип криоконсервирования//Сб. научн. тр. ”Моделирование криобиологических процессов“, Харьков, 1990.-С.3-12.
33. Гордиенко О.И., Гордиенко Е.А., Розанов Л.Ф. Пассивная утечка ионов калия из эритроцитов в средах, содержащих 1,2-пропандиол// Сб.научн.тр.”Фізико-

химические свойства и биологическое действие криопротекторов“, Харьков, 1990.-С.33-35.

34. Гордиенко О.И., Некоз И.А., Шейкин В.И. Водный диффузионный обмен и электрические характеристики эритроцитов в средах с криопротекторами//Сб.научн.тр. .”Физико-химические свойства и биологическое действие криопротекторов”, Харьков, 1990.-С.36-41.

35. Розанов Л.Ф., Гордиенко Е.А., Гордиенко О.И. и др. Фазовая теория строения клеток как основа для новой концепции криоповреждения и криозащиты//Сб.научн.тр.”Физико-химические процессы в криобиологических системах”, Харьков, 1991.-С.134-140.

36. Гордиенко О.И., Коваленко С.Е. Физический анализ взаимосвязи явлений гипотонического гемолиза и гипертонического криогемолиза// Сб. научн. тр. ”Актуальные вопросы репродуктологии и криомедицины”, Харьков, ХГМУ 1998, С.205-209.

37. Гордиенко О.И., Емец Б.Г., Жиликова Т.А., Шейкин В.И. Изучение водного транспорта через эритроцитарные мембраны в средах с различной ионной силой//Тез.1 Межд.конф.мол.ученых стран СЭВ, Братислава,1985.-С.36.

38. Пушкарь Н.С., Гордиенко О.И., и др. Физико-химические основы и перспективы развития технологии низкотемпературного консервирования биологических объектов//Тез. Междунар. конф. ”Достижения и перспективы развития криобиологии и криомедицины”, Харьков,1988.-С.79.

39. Гордиенко О.И. Влияние криопротекторов на проницаемость мембран эритроцитов для воды//Тез.2 Междунар.конф. “Успехи современной криобиологии”, Харьков, 1992.-С.67-68.

40. Gordiyenko E.O., Gordiyenko O.I., Kovalenko I.F., Rozanov L.F. Quantitative model of hypotonic lysis of cells and its experimental substantiation//The 31 Annual Meeting of the Society for Cryobiology, Japan, 1994.-P.28.

41. Гордієнко О.І., Паніна Ю.Є., Прокопюк О.С. Порівняльне вивчення властивостей мембран донорських та фетальних еритроцитів//Тези 1 з'їзду Українського товариства криобіології і криомедицини, Харків, 1995.-С.50-51.

42. Gordiyenko O.I., Gordiyenko E.O., Panina Yu.E., Prokopyuk O.S. Study of red blood cells membrane permeability using light scattering method//The 33 Annual Meeting of the Society for Cryobiology, USA, 1996.-P.161.

43. Гордієнко О.І., Паніна Ю.Є., Коваленко І.Ф. Визначення коефіцієнтів проникності мембран еритроцитів для криопротекторів//Тези 2 з'їзду Укр.біоф.тов., Харків, 1998.-С.202.

44. Panina Yu.E., Gordiyenko E.O., Gordiyenko O.I., Kovalenko I.F. The determination of erythrocyte membrane permeability coefficient for cryoprotectants//The 36 Annual Meeting of the Society for Cryobiology, France, 1999.-P.36.

45. Гордієнко О.І., Македонська В.О., Гордієнко Ю.Є. Біофізичні властивості

еритроцитів при гіпо- та гіпертиреозі//Пробл.криобиол.- 2001.-3.- С.70. Тези доп. Всеукраїнської конф. "Успіхи та перспективи розвитку кріобіології і кріомедицини".

46. Годієнко О.І., Ліннік Т.П. Проникність мембран еритроцитів до неелектролітів низки діолів//Тези III з'їзду Укр.біоф.тов., Львів, 2002. С.116.

47. Gordiyenko O.I., Linnik T.P. Permeability of erythrocyte membranes for a series of diols//The 14 Meeting of the European Association for Red Cell Research, France, 2003, P.6-7.

48. Gordiyenko O.I., Gordiyenko Yu.E., Makedonska V.O. Estimation of erythrocyte population state by the spherical index distribution//The 14 Meeting of the European Association for Red Cell Research, France, 2003, P.39.

АНОТАЦІЯ

Гордієнко О.І. Механізми пасивної проникності до неелектролітів та індекс сферичності еритроцитів людини. - Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора фізико-математичних наук за спеціальністю 03.00.02 – біофізика. - Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, м. Харків, 2004.

В роботі вперше отримано вираз для виробництва ентропії в системі “замкнута вибірково проникна мембрана – багатокомпонентний розчин” з урахуванням рівнянь руху окремих компонентів розчину. Виведені співвідношення між загальноприйнятими транспортними характеристиками біомембран та коефіцієнтами тертя між окремими компонентами системи для випадку замкнутої вибірково проникної мембрани довільної форми, що рухається. Розвинуто уявлення про фізичний механізм гіпотонічного гемолізу у розчинах проникаючої або непроникаючої речовини та побудовано фізико-математичні моделі цього процесу в обох випадках. На підставі побудованих моделей розроблено методи визначення коефіцієнтів пасивної проникності мембран еритроцитів для неелектролітів та щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності. За розробленим методом визначено коефіцієнти проникності еритроцитів для низки неелектролітів (діолів, амідів, гліцерину та його моноалкілових ефірів-18 речовин) та досліджено механізми їх проникання. Виявлено існування термоіндукованих змін енергій активації проникання в інтервалах температур 8-12°C, 18-20°C та 25-30°C. Досліджено розподіл еритроцитів за індексом сферичності в популяціях здорових дорослих донорів, при ендокринних патологіях та в пуповинній крові людини. За експериментальними даними впливу температури на розподіл еритроцитів за індексом сферичності визначено коефіцієнт теплового розширення мембран еритроцитів людини.

Ключові слова: фізико-математичне моделювання, трансмембранний масоперенос, еритроцити людини, пасивна проникність для неелектролітів, індекс сферичності.

АННОТАЦИЯ

Гордиенко О.И. Механизмы пассивной проницаемости для неэлектролитов и индекс сферичности эритроцитов человека. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук по специальности 03.00.02 – биофизика. – Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, г. Харьков, 2004.

В работе впервые получено выражение для производства энтропии в системе «замкнутая избирательно проницаемая мембрана – много-компонентный раствор» с учетом уравнений движения отдельных компонентов. Выведены соотношения между общепринятыми транспортными характеристиками биомембран и коэффициентами трения между отдельными компонентами системы. Развита представления о физическом механизме гипотонического гемолиза в растворах проникающего или непроникающего вещества и построены физико-математические модели этих процессов. На основе построенных моделей разработаны методы определения коэффициентов пассивной проницаемости мембран эритроцитов для неэлектролитов и плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности. Разработанным методом определены коэффициенты проницаемости эритроцитов для ряда неэлектролитов (диолов, амидов, глицерина и его моноалкиловых эфиров – 18 веществ) и исследованы механизмы их проникновения. Установлено, что исследованные вещества проникают в клетки как через белковые гидрофильные каналы определенного размера, образованные интегральным белком полосы 3, так и непосредственно через липидный бислой. Показано, что проникновение исследованных веществ через белковые каналы осуществляется вместе с молекулами воды, которые образуют их гидратные оболочки, и характеризуется критической зависимостью от диаметра молекул. Если этот параметр превышает $4 \text{ \AA}$, коэффициент проницаемости через белковые каналы резко уменьшается. Проведено теоретическое рассмотрение проникновения малых гидрофильных молекул через белковые каналы постоянного размера. Рассчитанные с учетом гидратации значения коэффициентов проницаемости через белковые каналы вполне удовлетворительно согласуются с полученными экспериментальными значениями. О проникновении липидным путем свидетельствует сильная корреляция проницаемости диолов и амидов через мембраны эритроцитов, проинкубированных с блокатором белковых каналов, с коэффициентами распределения между гидрофобной и гидрофильной фазами (коэффициент корреляции 0,94-0,99). Для проникновения липидным путем характерна также обратная зависимость от объема проникающих молекул. Изучено влияние температуры на проникновение

через мембраны эритроцитов 1,2-пропандиола и диметилсульфоксида. Показано существование термоиндуцированных изменений энергий активации проникновения этих веществ при температурах 8-12°C, 18-20°C и 25-30°C. Определенные температуры изломов аррениусовых зависимостей находятся в интервалах температур, известных как критические, в которых происходят изменения скоростей многих биологических процессов, связанных с мембранами эритроцитов. Наличие резкого излома аррениусовых зависимостей в диапазоне температур 8-12°C подтверждает связь путей проникновения исследованных молекул с белком полосы 3.

Разработанный простой и оригинальный метод определения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности, в отличие от известных методов определения геометрических характеристик эритроцитов, дает возможность получить не только среднее значение этого параметра, но и весь спектр его распределения в популяции эритроцитов. Экспериментально исследовано распределение эритроцитов по индексу сферичности в популяциях здоровых взрослых доноров, при эндокринных патологиях и в пуповинной крови человека. Показано, что данная характеристика варьирует у разных доноров, отображая, таким образом, состояние популяции эритроцитов отдельного донора. Большинство распределений здоровых взрослых доноров имеет вид, близкий к гауссовому, с максимумом при значении индекса сферичности 1,48. Индивидуальные кривые распределений эритроцитов пуповинной крови, как правило, имеют полимодальный характер и являются суммой нормальных распределений нескольких субпопуляций. Характерной чертой распределений эритроцитов у групп больных с эндокринной патологией является двух- и трехмодальный вид. В случае гипертиреоза среди клеток с нестандартным индексом сферичности больший удельный вес (около 25%) имеют клетки с меньшим индексом сферичности в диапазоне 1,07-1,22. При гипотиреозе кривые чаще имеют трехмодальный характер с повышенным удельным весом уплощенных клеток с индексом сферичности 1,65-1,46. Снижение температуры от 37°C до 3°C приводит к сдвигу максимумов распределений в область меньших индексов сферичности. По полученным экспериментальным данным определен коэффициент теплового расширения мембран эритроцитов человека, который имеет значение $k=2,4 \cdot 10^{-3} / ^\circ\text{C}$. Разработанный метод определения плотности распределения эритроцитов по индексу сферичности является чувствительным, хорошо воспроизводимым тестом для количественной оценки состояния популяции эритроцитов того или иного донора при разных патологиях или внешних воздействиях.

Ключевые слова: физико-математическое моделирование, трансмембранный массоперенос, эритроциты человека, пассивная проницаемость для неэлектролитов, индекс сферичности.

SUMMARY

Gordiyenko O.I. Mechanisms of passive permeability for non-electrolytes and spherical index of human erythrocytes. – Manuscript.

Thesis for obtaining the scientific degree of the Doctor in physical and mathematical sciences in specialty – 03.00.02 – Biophysics.- V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv 2004.

In the work for the first time the formula for entropy production in the system of selectively permeable membrane – polycomponent solution is obtained with consideration of equations of motion of solution's separate components. The derived correlation between biomembranes' standard transport characteristics and coefficients of friction between separate components of system in the case of closed selectively permeable moving membrane of random shape. There is developed a representation for physical mechanism of hypotonic haemolysis in permeable or non-permeable substances solutions and the physical and mathematical model of this process in both cases. Basing on developed models the methods for determining the passive permeability of erythrocyte membranes for non-electrolytes and density of erythrocytes distribution by spherical index are elaborated. Using the elaborated method the erythrocytes permeability coefficients for series of non-electrolytes (diols, amides, glycerol and its monoalkyl ethers – totally 18 substances) are determined and the mechanisms of their permeation are investigated. The existing of thermoinduced changes in permeation's activation energy in temperature intervals of 8-12°C, 18-20°C and 25-30°C is found. The erythrocytes distribution by spherical index in populations of healthy adult donors, by endocrine pathologies and in human cord blood is studied. Using the experimental data on temperature effect on erythrocytes distribution the coefficient of thermal expansion of human erythrocyte membrane was determined.

Key words: physical and mathematical modeling, transmembrane mass transfer, human erythrocytes, passive permeability for non-electrolytes, spherical index.

Наукове видання

ГОРДІЄНКО Ольга Іванівна

“Механізми пасивної проникності до неелектролітів та індекс сферичності еритроцитів людини”

Підписано до друку 1.02.2005 р. Формат 60х90 1/16

Друк офсетний. Умовн. др. арк. 1.9.

Наклад 100 прим. Зам. № 7

Видавництво МПП “Райдер”, м. Харків, вул. Артема, 4.