

УДК 577.344 + 612.014.481

## ЗАВИСИМОСТЬ ВЕЛИЧИНЫ ИЗМЕНЕНИЯ ТОЛЩИНЫ ПРИМЕМБРАННОГО ВОДНОГО ДИФФУЗИОННОГО СЛОЯ ЭРИТРОЦИТА ОТ ДЛИНЫ ВОЛНЫ ОБЛУЧАЮЩЕГО СВЕТА

Е.Б. Алмазова, В.А. Бондаренко, Б.Г. Емец, Е.Э. Перский

Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4

Поступила в редакцию 20 декабря 2005 г.

Методом ядерного магнитного резонанса определена толщина неперемешиваемого диффузионного слоя воды, непосредственно примыкающего к мембране эритроцита. Получено, что пятиминутное облучение ртутной лампой в «холодном режиме» уменьшает толщину неперемешиваемого слоя на 27 %. Показано, что селективное облучение линиями излучения ртути в видимой области спектра (546 нм) также приводит к уменьшению толщины примембранного водного слоя (на 15 %).

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** эритроцит, мембрана, неперемешиваемый примембранный водный диффузионный слой, ультрафиолетовое облучение.

В последние годы в медицине успешно применяется аутоотрансфузия облученной ультрафиолетовыми (УФ) лучами крови. Этот немедикаментозный метод хорошо зарекомендовал себя при лечении сложных патологических состояний. Высокую эффективность лечения тяжелых заболеваний путем переливания сравнительно небольшого объема УФ облученной собственной крови больных, объясняют тем обстоятельством, что соответствующие системы организма, обнаружив в русле крови поврежденные (или измененные) УФ лучами белки, мобилизуют свои ресурсы, способствуя выведению организма из патологического состояния. Иначе говоря, УФ облученный биоматериал, попав в организм, выполняет роль своеобразного раздражителя, запускающего механизм ответного реагирования [1, 2]. Сказанное означает, что существует некий оптимальный режим облучения, обеспечивающий, достаточные для запуска механизма ответного реагирования, изменения в облученном биоматериале. Указанные изменения следует оценивать по конкретному критерию. Естественным также является предположение, что необходимых изменений в биоматериале можно добиться и без участия УФ компоненты в облучающем свете. В настоящем сообщении предлагается в качестве критерия эффективности биологического действия облучающего света использовать толщину неперемешиваемого слоя воды, примыкающего к мембране эритроцита. По этому критерию проведено и сравнение уровня биологического влияния различных спектральных интервалов ртутного излучателя.

Если рассматривать пассивный перенос вещества через биомембрану, то последнюю упрощенно удобно представить как трехслойную систему, состоящую из липидного бислоя и, непосредственно примыкающих к нему с двух противоположных сторон, неперемешиваемых слоев водного раствора [3]. Такие неперемешиваемые жидкие слои принято называть гидродинамическими пограничными диффузионными слоями, поскольку молекулы и ионы могут пройти через указанные слои лишь путем диффузии [4]. Закон Фика связывает поверхностную плотность потока вещества  $j$  в направлении  $x$  с градиентом концентрации вдоль этого направления  $dc / dx$ :

$$j = -D dc / dx.$$

Здесь  $D$  – коэффициент диффузии. Рассмотрим сначала ситуацию, когда наличие примембранных пограничных слоев можно проигнорировать. В случае, если стационарный транспорт идет через тонкую мембрану, то производную  $dc/dx$  можно заменить конечной разностью концентраций (с двух ее сторон,  $\Delta c = c_I - c_{II}$ ), отнесенной к толщине мембраны  $L$ . Тогда

$$j = -D \Delta c / L = P (c_I - c_{II}). \quad (1)$$

Здесь введена проницаемость мембраны для диффундирующего вещества  $P = D / L$ . Вместо информации о проницаемости  $P$  в ряде случаев можно воспользоваться информацией о постоянной времени  $\tau$  процесса трансмембранного переноса. В [5] показано, что  $\tau = V / (P \cdot S)$ , где  $V$  – объем резервуара, образованный проницаемой мембраной площадью  $S$ . Если теперь принять во внимание наличие двух гидродинамически неподвижных (диффузионных) слоев воды, примыкающих с обеих сторон к липидной мембране, то сопротивление потоку диффузии (величина, обратная проницаемости  $P$ ) всей трехслойной системы

$$P^{-1} = P_{IM}^{-1} + P_M^{-1} + P_{MII}^{-1}. \quad (2)$$

Здесь  $P_M$  - проницаемость собственно липидной мембраны;  $P_{IM}$  - проницаемость первого (по направлению диффузионного переноса) пограничного слоя воды;  $P_{MII}$  - проницаемость второго (по направлению диффузионного переноса) пограничного слоя воды. Отметим, что сопротивления потоку примембранных неперемешиваемых слоев пропорциональны толщинам  $\delta_1$  и  $\delta_2$  этих слоев. Действительно, согласно вышеприведенному определению проницаемости:  $P_{IM}^{-1} + P_{MII}^{-1} = (\delta_1 + \delta_2) / D_w$ , где  $D_w$  - коэффициент диффузии молекул транспортируемого вещества в воде. Если принять приближение, что толщины этих примембранных слоев одинаковы, т. е.  $\delta_1 = \delta_2 = \delta$ , имеем

$$P_{IM}^{-1} + P_{MII}^{-1} = 2 \delta / D_w. \quad (3)$$

Подставляя (3) в (2) с учетом того, что  $P_M = D_m L^{-1}$ , получаем выражение для удвоенной толщины диффузионного примембранного слоя

$$2 \delta = D_w (P^{-1} - L / D_m). \quad (4)$$

Здесь  $D_m$  - коэффициент диффузии молекул вещества через липидный бислой мембраны толщиной  $L$ . Согласно [5], коэффициенты  $D_m$  и  $D_w$  практически не отличаются друг от друга ( $D_m \approx D_w$ ). Поэтому

$$2 \delta = D_w P^{-1} - L. \quad (5)$$

Согласно [5], толщина липидного бислоя мембраны  $L \approx 5 \cdot 10^{-9}$  м, т. е. составляет чрезвычайно малую долю общей толщины системы «мембрана плюс удвоенный примембранный диффузионный слой воды», конкретно,  $\sim 0,01$  %. Это означает, что, практически все время, необходимое для реализации переноса частицы из межклеточной среды в клетку (или в обратном направлении) тратится ею на преодоление водного диффузионного пограничного слоя; иными словами, именно этот примембранный слой является основным препятствием на пути частицы внутрь (или из) клетки. Учитывая это обстоятельство, а также то, что относительная погрешность измерения общей толщины системы ( $2\delta + L$ ) составляет  $\sim 1,2$  %, т. е. гораздо больше, чем та доля вклада ( $0,01$  %), которую составляет величина  $L$ , можно записать:

$$\delta_D = 0,5 D_w P^{-1} = 0,5 D_w S \tau / V. \quad (6)$$

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Образец человеческой донорской крови объемом  $0,6 \text{ см}^3$  помещался в стеклянную прямоугольную кювету; толщина слоя крови на дне кюветы -  $1,1 \text{ мм}$ .

Облучение производилось сверху. В качестве источника света использовалась безэлектродная ртутная лампа типа ВМР-1, применяемая в аппарате для УФ облучения аутокрови в лечебных целях, разработанном во ФТИНТ НАН Украины [6]. Эта лампа работала в режиме «холодного свечения», что вызвано требованием устранения нежелательного теплового нагрева крови за счет поглощения света в инфракрасной области спектра. Энергетическая освещенность слоя крови в кювете  $1,46 \text{ мВт/см}^2$ . Лампа ВМР-1 излучает на следующих основных спектральных линиях, возникающих при газовом разряде в парах ртути:  $\lambda_1 = 253,7 \text{ нм}$  (лучистый поток (ЛП) - 100 единиц);  $\lambda_2 = 312,6 \text{ нм}$  (ЛП - 1, 81 ед.);  $\lambda_3 = 365,0 \text{ нм}$  (ЛП - 1, 32 ед.);  $\lambda_4 = 404,7 \text{ нм}$  (ЛП - 1, 33 ед.);  $\lambda_5 = 435,8 \text{ нм}$  (ЛП - 4, 14 ед.);  $\lambda_6 = 546,1 \text{ нм}$  (ЛП - 3, 15 ед.);  $\lambda_7 = 577,0 \text{ нм}$  (ЛП - 0, 62 ед.).

В выполненных нами опытах были реализованы 2 варианта: в первом свет от лампы попадал беспрепятственно в кровь, в другом он проходил через стандартные селективные светофильтры [7]; их комбинации подобраны так, чтобы реализуемые полосы пропускания соответствовали указанным выше спектральным линиям (см. табл. 1).

Реакция эритроцитов на облучение оценивалась по изменению толщины пограничного диффузионного водного слоя  $\delta$ . Его определение велось путем подстановки в формулу (6) значения постоянной времени ( $\tau$ ) процесса переноса молекул воды через мембрану. Постоянная времени  $\tau$  определялась с помощью релаксометра ядерного магнитного резонанса (ЯМР) [8] по методике «парамагнитного допинга» [9]. Параметр  $\tau$  является временем диффузионного обмена через эритроцитарную мембрану молекул воды, содержащихся в межклеточной среде и молекул воды, содержащихся в эритроците. Для проведения измерений ампула с облученной кровью помещается в рабочую ячейку ЯМР-релаксометра; его рабочая частота -  $15,9 \text{ МГц}$ . Методика «парамагнитного

## Зависимость величины изменения толщины примембранного ...

дизайна" позволяет определить значение времени  $\tau$ , усредненное по всем нативным эритроцитам, находящимся в ампуле.

Таблица 1

Параметры комбинаций стандартных светофильтров

Комбинация светофильтров	ЖС-3 и УФС-2	БС-5 и УФС-6	ЖС-10 и ПС-13	ЖС-11 и СС-15	ЗС-8 и ЖС-18
Длина волны максимума пропускания $\lambda_{\max}$ , нм	312	363	397	436	540
Пропускание на $\lambda_{\max}$ , %	17	46	34	44	49

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Нами выполнены ЯМР-измерения, в результате которых определена постоянная времени диффузионного водного обмена через мембраны эритроцитов  $\tau = (11,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$  с. Подставив это значение в (6), а также считая в соответствии с [10], численные значения объема эритроцита  $V = 8,7 \cdot 10^{-17}$  м<sup>3</sup>, площади его поверхности  $S = 1,63 \cdot 10^{-10}$  м<sup>2</sup>, приняв для воды при 25 °С [11]  $D_w = 2,5 \cdot 10^{-5}$  см<sup>2</sup>/с, вытек получаем проницаемость  $P = (4,85 \pm 0,05) \cdot 10^{-5}$  см/с, толщину непреремешиваемого пограничного водного слоя  $\delta = (2,57 \pm 0,06) \cdot 10^{-5}$  м. Величина пограничного слоя жидкости во многом определяется размерами белковых включений, выступающих из липидного слоя, составляющих поверхностный рельеф клетки – гликокаликс. По данным [12], УФ облучение вызывает деструкцию гликокаликса. Естественно ожидать, что это обстоятельство скажется и на толщине водного непреремешиваемого слоя. Ниже приведены данные, иллюстрирующие зависимость толщины пограничного водного слоя от продолжительности облучения полным потоком лампы ВМР-1.

Таблица 2

Зависимость толщины примембранного водного слоя  $\delta$  от продолжительности УФ облучения

Продолжительность облучения, мин	0	1	2,5	4	5	10
Толщина $\delta \cdot 10^5$ , м	2,57±0,06	2,49±0,06	2,23±0,06	1,91±0,06	1,87±0,06	1,82±0,06

Очевидно, что экспозиция в 1 – 4 минуты демонстрирует уже достаточно ощутимую величину эффекта; этот результат согласуется с медицинской практикой, где в терапевтических целях применяется экспозиция такого же порядка [1]. Одним из «ответов» клетки на облучение является снижение ее барьерных свойств, уменьшение толщины примембранного водного слоя. Последнее, безусловно, может быть вызвано деструкцией гликокаликса, т. е. той же причиной, которой, согласно [1, 2] объясняется лечебное действие УФ облученной крови. Это обстоятельство свидетельствует в пользу того, чтобы рассматривать изменение толщины пограничного примембранного диффузионного водного слоя в качестве параметра, характеризующего достигнутый уровень влияния облучения на клетку, использовать этот параметр в качестве критерия эффективности биологического воздействия.

Деструкция гликокаликса и, следовательно, уменьшение толщины пограничного диффузионного слоя эритроцитарной мембраны могут быть достигнуты не только облучением крови полным светом спектральной лампы, но и путем селективного облучения образца отдельными линиями ее спектра. С целью реализации соответствующего эксперимента, для выделения конкретных спектральных линий излучения лампы мы применили описанные в таблице 1 комбинации светофильтров.

Очевидно, во всех случаях селективного облучения толщина примембранного диффузионного слоя уменьшается. Обращает на себя внимание тот факт, что уровень влияния ультрафиолетовых лучей (312,6 нм и 365,0 нм) на толщину пограничного примембранного слоя не столь уж значительно превышает по величине уровень влияния линий излучения видимой области (404,7 нм, 435,8 нм, 546,1 нм). Как известно, эффективность воздействия волн ультрафиолетового диапазона на материалы обусловлена сравнительно высокими энергиями соответствующих квантов излучения, достаточных для разрушения внутримолекулярных связей. Энергии же квантов видимого света для достижения таких результатов недостаточны; действие последних приводит, в основном, к нагреванию. Полученный в данном эксперименте результат указывает на немаловажность теплового вклада полного потока УФ излучателя в процесс уменьшения толщины примембранного слоя а, следовательно, и в процесс разрушения гликокаликса.

Таблица 3

Изменение толщины примембранного водного слоя  $\delta$ , обусловленное четырехминутным селективным освещением отдельными спектральными линиями ртутной лампы

Длина волны излучения, нм	Необлуч. образец	312,6	365,0	404,7	435,8	546,1
Комбинация светофильтров		ЖС-3 и УФС-2	БС-5 и УФС-6	ЖС-10 и ПС-13	ЖС-11 и СС-15	ЗС-8 и ЖС-18
Толщина слоя $\delta \cdot 10^5$ , м	2,57±0,06	2,04±0,06	2,06±0,06	2,27±0,06	2,32±0,06	2,18±0,06
$\Delta\delta/\delta_{\text{необл}}$ , %	0	- 20,6	- 19,8	- 11,7	- 9,7	- 15,2

Из данных таблицы 3 следует вывод о возможности достижения одинакового эффекта (по изменению толщины примембранного слоя) как при использовании четырехминутного облучения ультрафиолетовой линией ( $\lambda = 312,6$  нм), так и более продолжительным облучением зеленой линией ( $\lambda = 546,1$  нм). Безусловно, это утверждение совершенно не означает, что в случае облучения аутокрови лучами зеленого цвета будет достигнут терапевтический эффект; на этот вопрос ответят только соответствующие исследования. Тем не менее, если принять, что в механизме лечебного действия УФ облучения крови важную роль играет факт разрушения гликокаликса, то возможность вместо УФ лучей использовать для терапии электромагнитные волны видимой области спектра не должна быть исключена из рассмотрения.

### ВЫВОДЫ

1. Экспериментами на эритроцитах показано, что излучение ртутной УФ лампы уменьшает толщину пограничного примембранного диффузионного слоя воды.
2. Предложено использовать величину изменения толщины пограничного примембранного диффузионного слоя воды в качестве количественного критерия уровня эффективности влияния ЭМ излучения на клетку.
3. Обнаружено, что в случае применения ртутной лампы, работающей в режиме «холодного свечения», уровни влияния линии излучения УФ диапазона (365 нм) и линии видимой области (546 нм) близки по эффективности. Это обстоятельство позволяет прогнозировать успехи на пути поиска эффективных терапевтических приемов, использующих облучение волнами видимой области света.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Самойлова К. А., Дуткевич И. Г. Фотобиологические процессы в клетках и плазме крови и их роль в лечебно-оздоровительном действии УФ излучения // Механизмы влияния облученной ультрафиолетовыми лучами крови на организм человека и животных. Ленинград. Наука, 1986. С. 154-177.
2. Сафронов В. В., Воеводин Д. А. Механизм влияния ультрафиолетового облучения крови на организм в эксперименте // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1992. № 2. С. 145.
3. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М. Изд-во МГУ, 1985. 190 с.
4. Левич В. Г. Физико-химическая гидродинамика. М. Физматгиз, 1959. 699 с.
5. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М. Мир, 1980. 338 с.
6. Погребняк П. С., Леонтьев В. С., Благой Ю. П., Веркин Б. И. Исследование спектральных и энергетических характеристик аппаратов для ультрафиолетового облучения крови. Препринт 44-87. Харьков. ФТИНТ АН УССР, 1987. 17 с.
7. Государственный стандарт Союза ССР. Стекло цветное оптическое. ГОСТ 9411-66. Издание официальное. М. Госкомитет стандартов СМ СССР, 1972. 55 с.
8. Абрагам А. Ядерный магнетизм. М. Изд. ин. лит., 1963. 551 с.
9. Conlon T., Outhred R. Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR – technique // Biochem. and Biophys. Acta. 1972. V. 282. No 2. P. 354-361.
10. Воробьев А. И., Бриллиант М. Л., Андреева Н. Е. и др. Руководство по гематологии. Т. 1. М. Медицина, 1985. 448 с.
11. Таблицы физических величин. Справочник. (Под ред. Кикоина И. К.) М. Атомиздат, 1976. 1008 с.
12. Арцишевская Р. А., Самойлова К. А. Функциональные и структурные изменения поверхности эритроцитов человека после облучения УФ лучами разной длины волны // Цитология. 1983. Т. 25. № 12. С. 1387-1392.