

УДК 537. 868 + 577. 352. 868

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

ВЛИЯНИЕ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО СВЧ – ИЗЛУЧЕНИЯ НА ЭФФЕКТИВНУЮ ТОЛЩИНУ НЕПЕРЕМЕШИВАЕМОГО СЛОЯ ВОДЫ, ПРИМЫКАЮЩЕГО К МЕМБРАНЕ ЭРИТРОЦИТА

Б. Г. Емец

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

Поступила в редакцию 1 октября 1999 г.

С помощью ядерного магнитного резонанса определена толщина перемешиваемого слоя воды, непосредственно примыкающего к мембране эритроцита. Получено, что получасовое облучение низкоинтенсивными микроволнами уменьшило эффективную толщину перемешиваемого слоя на 11 %. Показано, что для объяснения этого результата недостаточно рассмотрения одних только тепловых процессов в образце.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: эритроцит, мембрана, диффузионный водный обмен, перемешиваемый примембранный слой жидкости, электромагнитные микроволны.

К настоящему времени широкое распространение технологических процессов, использующих электромагнитные (ЭМ) колебания, и развитие беспроводных средств связи обусловило все возрастающий уровень ЭМ загрязнения среды обитания человека. Традиционно велик интерес к проблематике биологического влияния радиоволн СВЧ-диапазона; здесь наиболее подробно исследованы процессы, происходящие при облучении биосистем высокими и средними уровнями энергии [1]. Биологические эффекты влияния низкоинтенсивных электромагнитных волн изучены гораздо меньше; нет единого мнения о механизмах взаимодействия “дотепловых” мощностей с биосредами [2, 3]. Для выработки правильного решения проблемы необходимы исследования на клеточном и мембранном уровне. В настоящей работе изучаются изменения ряда параметров эритроцитарной мембраны, вызванные низкоинтенсивными микроволнами.

При исследовании процессов пассивного транспорта вещества через биомембрану, последнюю принято рассматривать (в упрощенной модели), как трехслойную композицию – липидный бислой и непосредственно примыкающие к нему с двух противоположных сторон перемешиваемые слои водного раствора [4, 5]. Молекулы и ионы могут пройти из межклеточного пространства в клетку через перемешиваемые слои только путем диффузии: это обстоятельство в литературе принято подчеркивать, называя указанные слои перемешиваемыми диффузионными слоями Нернста.

В общем случае диффузия вещества через тонкую мембрану описывается первым законом Фика; он связывает поток вещества J с градиентом концентрации C вдоль направления переноса x : $J = -D \, dC / dx$. (Здесь D – коэффициент диффузии). В случае стационарного транспорта через тонкую мембрану производную от концентрации можно заменить конечной разностью концентраций ($C_a - C_b$), отнесенной к толщине мембраны L . Тогда

$$J = -D \, \Delta C / \Delta x = -D (C_a - C_b) / L = P (C_a - C_b) \quad (1)$$

Здесь введена проницаемость мембраны для диффузионного транспорта $P = D/L$.

Измерив разность концентраций ($C_a - C_b$) и величину потока J , можно определить проницаемость мембраны $P_{изм}$. Однако, в реальном случае, когда, на самом деле, с двух сторон липидной мембраны к ней примыкают диффузионные слои Нернста, концентрации C_a и C_b измеряются не непосредственно у противоположных поверхностей липидного бислоя, а у двух наружных поверхностей перемешиваемых слоев раствора. Поэтому истинную проницаемость $P_{ист}$ следует вычислять с соответствующей поправкой [4]:

$$P_{ист} = J / [C_a - C_b - (\Delta C)_1 - (\Delta C)_2].$$

Здесь $(\Delta C)_1 = J (D_1 / \delta_1)^{-1}$ и $(\Delta C)_2 = J (D_2 / \delta_2)^{-1}$, где δ_1 и δ_2 – толщины соответственно “переднего” и “заднего” (по направлению наблюдения) перемешиваемых примембранных слоев; D_1 и D_2 – коэффициенты диффузии молекул через указанные слои; $(\Delta C)_1$ и $(\Delta C)_2$ – разности концентраций на двух противоположных сторонах каждого из перемешиваемых слоев. С учетом сказанного

Влияние низкоинтенсивного СВЧ-излучения на эффективную толщину...

$$P_{\text{ист}} = (1/P_{\text{изм}} - \delta_1/D_1 - \delta_2/D_2)^{-1}. \quad (2)$$

Приняв приближение, что и “передний” и “задний” неперемешиваемые слои имеют одинаковую толщину ($\delta_1 = \delta_2 = \delta$) и, что коэффициенты диффузии молекул, проходящих через них, одинаковы ($D_1 = D_2 = D$), получаем выражение для удвоенной толщины неперемешиваемого слоя

$$2\delta = D(1/P_{\text{изм}} - 1/P_{\text{ист}}) \quad (3)$$

Выполнив измерения параметров, входящих в (3), для случаев суспензий клеток, экспонированных в СВЧ – поле, можно проследить зависимость 2δ от характеристик облучения.

Формула (3) может быть представлена в виде [4]:

$$2\delta = D(S\tau/V - L_m/D_m). \quad (4)$$

Здесь учтено, что проницаемость собственно мембраны $P_{\text{ист}} = D_m/L_m$, где L_m – толщина липидного бислоя, D_m – коэффициент диффузии вещества через бислой, а $P_{\text{изм}}$ может быть выражена через постоянную времени τ переноса вещества через мембрану, S – площадь поверхности клетки, V – объем клетки.

В работе рассматривается, какое значение принимает 2δ в ответ на СВЧ-облучение.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

Исследования выполнены на эритроцитах донорской крови человека при 25 °С. Для измерения величины водной диффузионной проницаемости мембраны $P_{\text{изм}}$ использовался ядерный магнитный резонанс (ЯМР) [6], позволяющий методом “парамагнитного допинга” [7] определить постоянную времени τ процесса переноса молекул воды через эритроцитарную мембрану.

Суспензия эритроцитов (объем 0,6 см³, соотношение эритроцитарной массы и физиологического раствора 1:1) помещалась в цилиндрическую ампулу из стекла сорта “пирекс”. Облучение велось генератором типа Г 4 – 141 с использованием диэлектрического (фторопласт) волновода, погруженного непосредственно в суспензию. Рабочая частота 50 ГГц ($\lambda = 6$ мм); выходная мощность 4 мВт.

Измерения τ велись с помощью ЯМР – релаксометра, рабочая частота 15,9 МГц.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Методом ЯМР определена постоянная времени диффузионного водного обмена через мембраны необлученных эритроцитов $\tau = (11,0 \pm 0,1) \cdot 10^{-3}$ с. Подставив это значение в (4), а также, следуя [8], объем эритроцита $V = 8,7 \cdot 10^{-11}$ см³, площадь его поверхности $S = 1,63 \cdot 10^{-6}$ см², параметры липидного бислоя [4, 9, 10, 11]: $L_m = 5$ нм, $D_m = 10^{-5}$ см²/с, приняв для воды при 25 °С [12] $D = 2,5 \cdot 10^{-5}$ см²/с, имеем $P_{\text{изм}} = (4,85 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$ см/с; $P_{\text{ист}} = (20,0 \pm 0,4)$ см/с; $2\delta = (5,15 \pm 0,06) \cdot 10^{-3}$ см. Из полученного следует, что “проницаемость” суммарного неперемешиваемого слоя $\Pi = D/2\delta = (4,85 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$ см/с в пределах указанной точности равна проницаемости мембраны $P_{\text{изм}}$. Это означает, что процесс переноса лимитируется диффузией в неперемешиваемых слоях и слабо зависит от свойств мембраны.

В таблице 1 приведена зависимость постоянной времени трансмембранного водного обмена τ , а также $P_{\text{изм}}$ и эффективной толщины неперемешиваемого слоя 2δ от продолжительности микроволнового облучения. (В ходе облучения температура образца, измеренная с точностью до 0,2 °С, не изменилась).

Таблица 1. Зависимость τ , $P_{\text{изм}}$ и $2\delta_{\text{эфф}}$ от продолжительности СВЧ – облучения

Продолжительность облучения, мин	0	5	10	15	20	30
$\tau \cdot 10^3, \text{ с}$	11,0 ± 0,1	10,7 ± 0,1	10,6 ± 0,1	10,0 ± 0,1	9,8 ± 0,1	9,7 ± 0,1
$P_{\text{изм}} \cdot 10^3, \text{ см/с}$	4,85 ± 0,05	4,99 ± 0,05	5,04 ± 0,05	5,34 ± 0,05	5,45 ± 0,05	5,50 ± 0,05
$2\delta_{\text{эфф}} \cdot 10^3, \text{ см}$	5,15 ± 0,06	5,01 ± 0,06	4,96 ± 0,06	4,68 ± 0,06	4,59 ± 0,06	4,54 ± 0,06

Очевидно, что СВЧ – облучение повышает проницаемость эритроцитарных мембран $P_{изм}$, причем этот эффект проявляется тем сильнее, чем больше экспозиция.

Как отмечено выше, проницаемость эритроцитарной мембраны лимитируется не липидным бислоем, а примембранными неперемешиваемыми слоями водного раствора. Поэтому естественно предположить, что увеличение температуры поднимет проницаемость $P_{изм}$, поскольку рост температуры ослабляет межмолекулярные связи в жидкости (например, плотность воды при повышении температуры с 25 °С до 30 °С уменьшается на 0,084 %), а значит, должна уменьшиться и толщина неперемешиваемого слоя. Мы выполнили соответствующие измерения, получив при повышении температуры на 4 °С такое же увеличение проницаемости (на 13 %), которое наблюдается при 30 – минутном СВЧ-облучении. Расчет толщины неперемешиваемого слоя при этой повышенной температуре (29 °С) дает $2\delta = (5,00 \pm 0,05) \cdot 10^{-3}$ см. (При этом учтен рост D с температурой [12]). Конечно, трудно предположить, что 5 – минутное СВЧ – облучение при практически неизменной температуре уменьшит толщину примембранного слоя на ту же величину, что и нагрев на 4 °С. Повидимому здесь следует говорить о влиянии СВЧ-облучения на изменение не абсолютной, а эффективной толщины примембранного слоя $\delta_{эфф}$.

Таким образом, для объяснения полученного результата недостаточно рассмотрения процессов диссипации в тепло микроволновой энергии в образце. Специфическое влияние СВЧ – волн может быть объяснено, если учесть наличие в реальной жидкости (в воде) растворенного воздуха и воздуха в свободном состоянии (пузырьки). Согласно [13], в воде суммарный объем пузырьков составляет стомиллионную долю общего объема растворенного воздуха. Известно, что повышение температуры уменьшает растворимость воздуха в воде. Конкретно, объем растворенного в ней воздуха при 20 °С ($18,26 \cdot 10^{-3}$ см³ в 1 мл H₂O) на 1,7 % больше, чем при температуре 21 °С ($17,95 \cdot 10^{-3}$ см³ в 1 мл H₂O) [14]. Следовательно, при повышении температуры на 1 градус, в жидкости появляются “лишние” молекулы газа, которые должны покинуть жидкость. Однако, немедленно уйдут из жидкости лишь те из них, которые оказались вблизи открытой поверхности жидкости вверху. Все остальные “лишние” молекулы, сталкиваясь друг с другом, объединяются в кластеры, а затем и в пузырьки, взвешенные в объеме жидкого образца. Суммарный объем “пузырькового” воздуха при этом может увеличиться на несколько порядков по отношению к норме. В гипотетическом случае, если представить, что все без исключения, “лишние” молекулы воздуха объединились в пузырьки, суммарный объем последних возрастет в $1,7 \cdot 10^5$ раз. Соответственно, в 170 тысяч раз увеличится (по сравнению с нормой) и количество воздушных пузырьков в объеме жидкости. Конечно, приведенная оценка является достаточно приближенной. Тем не менее, следует допустить, что при СВЧ-нагреве даже на 0,001 градуса количество пузырьков может увеличиться в несколько десятков раз против нормы. Эти “дополнительные” пузырьки, радиусом $2 \cdot 10^{-9}$ м [15], диффундируют по всему объему, проникая, в том числе, и в примембранный слой, разрыхляя последний. В результате, эффективная толщина примембранного слоя уменьшается до значений, наблюдаемых в эксперименте.

Необходимым условием для накопления “лишних” пузырьков в образце в ходе СВЧ-облучения является отсутствие конвекции в жидкости. При конвекции крупномасштабные перемещения жидких слоев выносят на свободную поверхность и “лишние” молекулы растворенного воздуха и “лишние” пузырьки. Конвекция возникает при выполнении критерия Рэлея, связывающего разность температур на границах сосуда с жидкостью, размеры сосуда и физические характеристики жидкости [16]. Конвекции можно избежать, если подводить к жидкости ЭМ колебания достаточно низкой интенсивности, что и реализовано в вышеописанных экспериментах.

ВЫВОДЫ

1. Наблюдено увеличение проницаемости эритроцитарных мембран для диффузионного водного обмена, обусловленное низкоинтенсивным микроволновым облучением. (Получасовая экспозиция при практически неизменной температуре повышает ее на 13 %. Такое же увеличение проницаемости наблюдается при нагреве эритроцитов на 4 °С).
2. Показано, что для эритроцитарных мембран проницаемость лимитируется диффузией в примембранных слоях и слабо зависит от свойств мембраны. Получено, что получасовое облучение уменьшает эффективную толщину примембранного неперемешиваемого слоя на 11 %.
3. Предложено интерпретировать наблюдаемое разрыхление примембранного слоя увеличением концентрации в нем воздушных микропузырьков, которое стимулировано облучением.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Минин Б. А. СВЧ и безопасность человека. М. Сов. радио, 1974. 352 с.
2. Исмаилов Э. Ш. Биофизическое действие СВЧ-излучений. М. Энергоатомиздат, 1987. 144 с.
3. Девятков Н. Д., Голант М. Б., Бецкий О. В. Миллиметровые волны и их роль в процессах жизнедеятельности. М. Радио и связь, 1991. 168 с.
4. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М. Мир, 1980. 338 с.
5. Болдырев А. А. Биологические мембраны и транспорт ионов. М. Изд-во МГУ, 1985. 190 с.
6. Абрагам А. Ядерный магнетизм. М. Изд. ин. лит., 1963. 551 с.
7. Conlon T., Outhred R. Water diffusion permeability of erythrocytes using an NMR – technique. // Biochem. and Biophys. Acta. 1972. V. 288. No 2. P. 354 – 361.
8. Воробьев А. И., Бриллиант М. Л., Андреева Н. Е. и др. Руководство по гематологии. Т. 1. М. Медицина, 1985. 448 с.
9. Кагава Я. Биомембраны. М. Высшая школа, 1985. 303 с.
10. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Структура и функции эритроцитарных мембран. Минск. Наука и техника, 1981. 216 с.
11. Ивков В. Г., Берестовский Г. Н. Динамическая структура липидного бислоя. М. Наука, 1981. 296 с.
12. Таблицы физических величин. Справочник. (Под ред. Кикоина И. К.) М. Атомиздат, 1976. 1008 с.
13. Бункин Н. Ф., Бункин Ф. В. Бабстоны – стабильные газовые микропузырьки в сильно разбавленных растворах электролитов. // ЖЭТФ. 1992. Т. 101. № 2. С. 512-527.
14. Справочник по растворимости (ред. Кафаров В. В.). Том 1. Книга 1. М. –Л. Изд-во АН СССР, 1961. 960 с.
15. Бункин Н. Ф., Виноградова О. И., Куклин А. И., Лобеев А. В., Мовчан Т. Г. К вопросу о наличии воздушных субмикропузырьков в воде : эксперимент по малоугловому рассеянию нейтронов. // Письма в ЖЭТФ. 1995. Т. 62. № 8. С. 659-662.
16. Гершуни Г. З., Жуховицкий Е. М. Конвективная устойчивость несжимаемой жидкости. М. Наука, 1972. 392 с.