УДК 577.344 + 612.014.481 DOI 10.31548/energiya2020.03.109

КОГЕРЕНТНЕ ТА МОНОХРОМАТИЧНЕ ВИПРОМІНЮВАННЯ ЗМІНЮЄ ЧАС ГЕМОЛІЗУ ЕРИТРОЦИТІВ, А ТАКОЖ ШВИДКІСТЬ ЗУСТРІЧНОГО ПЕРЕМІЩЕННЯ ІОНІВ КРІЗЬ ЕРИТРОЦИТАРНУ МЕМБРАНУ

О. Б. Алмазова, старший викладач кафедри фізики

Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут»

E-mail: alonushka.alona27@gmail.com

М. Л. Лисиченко, доктор технічних наук, професор

Харківський національний технічний університет сільського господарства імені Петра Василенка

E-mail: 1prlysychenko@ukr.net

Анотація. *Еритроцити послідовно опромінювали низькоінтенсивним лазером (λ = 640 нм), «фіолетовим» світлодіодом (λ = 400 нм), «зеленим» світлодіодом (λ = 540 нм), «жовтим» світлодіодом (λ = 592 нм). Методом кислотних (хімічних) еритрограмм і методом зустрічного транспорту порівнювали кінетичні характеристики в опромінених і неопромінених зразках крові.*

Отримано: - методом кислотних еритрограмм виявлено, що в опромінених зразках крові відбувається зменшення часу напівгемолізу;

- низькоінтенсивне лазерне випромінювання, а також випромінювання світлодіодів збільшують швидкість зустрічного переміщення іонів через еритроцитарні мембрани.

- зменшення часу напівгемолізу і збільшення швидкості зустрічного перенесення іонів, опромінених зразків крові, обумовлене зменшенням «ефективної» товщини примембранного дифузійного шару - неперемішуваного шару води, що примикає до мембрани еритроцита.

Зменшення «ефективної» товщини примембранного водного шару (мінімальний в діапазоні довжин хвиль 570-590 нм і 630 640 нм) змінює швидкість обмінних процесів у системі «клітина - міжклітинне середовище», змінюючи режим функціонування клітини. Змінений режим функціонування - біологічна відповідь на світлове випромінювання. Червоні клітини крові зі зміненим режимом функціонування, є сигналами-подразниками, які змушують організм мобілізувати ресурси на боротьбу з патологією. Ці обставини можуть прогнозувати створення універсальної фототерапевтичної апаратури для екстракорпорального опромінення крові на базі світлодіодів з певними параметрами впливу.

Ключові слова: ***еритроцит; зразки крові, що опромінені низькоінтенсивним лазером; опромінені світлодіодами; метод кислотних (хімічних) еритрограмм; примембранний дифузійний шар***

Актуальність. У світі широко відомі такі види фототерапевтичного опромінення крові.

1. Внутрішньовенне лазерне опромінення крові. Внутрішньовенне лазерне опромінення крові (ВЛОК) здійснюється in vivo шляхом подачі світла низькоінтенсивного лазера в судинний канал, як правило, в вену передпліччя, за припущення, що терапевтичний ефект буде поширюватися через кровоносну систему. ВЛОК терапія посилює регенерацію тканин, знімає запальний процес, покращує оксигенну функцію, знімає м'язовий спазм, розслабляє стінки судин, коригує продуктивність кісткового мозку. ВЛОК зв'язує токсини, зменшує циркуляцію вірусів, що знаходяться в організмі, тим самим протистоїть і короновірусу COVTD - 19, а якщо пацієнт заражений, перенесе захворювання в легкій формі. Призначається в складі комплексної терапії.

2. Крізьшкірне (надвенне) лазерне опромінення крові. При кризьшкірному (надвенному) впливі лазерний промінь спрямований на неушкоджену шкіру в область великих кровоносних судин (наприклад, в бік загальної сонної артерії або надключичній області).

3. Екстракорпоральне опромінення крові. Використовується для ультрафіолетового опромінення крові, передбачає забір крові через вену і опромінення її поза тілом, у спеціальній кюветі. Раніше кров опромінювали за допомогою УФ (ультрафіолетових) ламп, зараз - за допомогою лазера (екстракорпоральне лазерне опромінення крові) - ЕЛОК. Екстракорпоральне ультрафіолетове опромінення крові (ЕУФОК) і подальша її внутрішньовенна реінфузия є найбільш відомим, поширеним і вивченим методом гемотерапії. Метод УФОК - це очищення крові УФ опроміненням з метою поліпшення її якості, профілактики лікування захворювань. Багато хвороб на клітинному рівні погано піддаються медикаментозної дії (діабет, тромбоз, хронічні хвороби органів

дихання). УФОК крові відкриває нові можливості для відновлення якості її складу, поліпшення самопочуття хворих. В умовах підвищеної захворюваності в зимовий час і міжсезоння метод дає відмінну можливість захистити організм від вірусної атаки. Під дією ультрафіолетового опромінювання клітини крові оновлюють захисну мембрану, необхідну при вірусному навантаженні для збереження імунітету. Нині при активному поширенні короновірусу, УФОК крові став відмінним засобом запобігання зараження COVTD - 19 і частиною комплексної терапії.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. Одна з найбільш поширених версій, що пояснює позитивну дію ЕУФОК, полягає в тому, що опромінені клітини крові, введені в вену хворому, виконують роль своєрідного подразника. У відповідь на це організм мобілізує свої ресурси, що і забезпечує лікувальний ефект [1,4]. Звідси випливає, що існує якийсь оптимальний режим опромінення, що забезпечує достатні для запуску механізму відповідного реагування зміни в опроміненому біоматеріалу. Можна також припустити, що необхідних змін в біоматеріалі можна домогтися і без участі УФ компоненти в опромінюючому світлі. В якості критерію ефективності біологічної дії опромінюючого світла пропонується використовувати товщину неперемішуваного шару води, що примикає до мембрани еритроцита [4]. За цим критерієм проведено і порівняння рівня біологічного впливу різних спектральних інтервалів ртутного випромінювача.

Методом ядерного магнітного резонансу (ЯМР) (спінове відлуння) авторами були проведені дослідження щодо ефективного впливу електромагнітного випромінювання (ЕМВ) ультрафіолетового і оптичного діапазону на еритроцити людини. Об'єктом дослідження був примембранний водний шар еритроцитів [4, 6]. Досліджувалася вплив ЕМВ УФ і оптичного діапазону на «ефективну» товщину примембранного шару еритроцитів (δ), (в неопромінених зразку $\delta = 2{,}57 \cdot 10\text{-}5$ м) [4, 6]. Було встановлено, що УФ опромінення (опромінення велося газорозрядною ртутною лампою типу ВМТ) ($\lambda = 253{,}7$ нм) зменшує товщину примембранного шару на 25 %; селективне опромінення спектральними лініями (газорозрядної ртутної

лампою типу ВМТ) (λ = 312,6 нм) і (λ = 577 нм) дають зменшення примембранного шару на 18 % [1]. Вплив гелій-неоновим лазером (λ = 640 нм) зменшило примембранний шар на 15 % [4]. Зменшення «ефективної товщини» примембранного водного шару змінює швидкість обмінних процесів у системі «клітина - міжклітинне середовище», змінюючи режим функціонування клітини, який є біологічною відповіддю на опромінення вище переліченими довжинами хвиль. Еритроцити зі зміненим режимом функціонування, є сигналами-подразниками, які змушують організм мобілізувати ресурси на боротьбу з хворобою.

Практично вся сучасна фототерапевтична апаратура, якою впливають на кров людини і на організм в цілому створена із застосуванням лазерів і громіздких УФ ламп (прилади: «Ізольда - ЕЛОК», «Матрикс - ВЛОК», «Соларіс», «Юлія» та ін.). Прилади на основі лазерів і УФ ламп небезпечні, досить дороги, вимагають спеціальної підготовки персоналу. Існує необхідність вивчення можливості заміни лазерів і УФ ламп в апаратурі для фототерапії на більш безпечні, дешеві, більш прості в експлуатації джерела ЕМІ - світлодіоди.

У цій роботі ми не тільки порівняємо результати отримані методами кислотних еритрограмм і зустрічного транспорту з результатами, отриманими методом ЯМР за впливом випромінювання лазерів і світлодіодів на примембранний шар в біоматеріалі, а й визначимо ефективні довжини хвиль, що найбільш впливають на біоматеріал для подальшого створення фототерапевтичної апаратури на світлодіодах.

Мета дослідження. 1. Вивчення впливу лазера і світловипромінювальних діодів методом кислотних еритрограмм і методом зустрічного транспорту на «ефективну» товщину примембранного шару в еритроцитах.

2. Визначення діапазону довжин хвиль, що впливають найбільше на зразки крові для подальшого створення універсальної фототерапевтичної апаратури для екстракорпорального опромінення крові на базі світловипромінювальних діодів.

Матеріали і методи дослідження. Метод хімічних (кислотних) еритрограмм. У цій роботі досліджували еритроцити донорської крові людини методом хімічних (кислотних) еритрограмм, який дозволяє визначити якісний склад крові, заснований на фотоелектричному вимірюванні гемолізу під дією кислоти. Параметрами, за якими визначали біологічну відповідь на вплив акустичних випромінювань, були мода (максимум функції розподілу статистичного ансамблю), ширина на напіввисоті (характеризує ступінь однорідності еритроцитів по їх кислотної стійкості), час напівгемолізу (час, протягом якого руйнується половина клітин крові), і коефіцієнт асиметрії (що характеризує ступінь однорідності клітин крові за віком).

Принцип методу дослідження розподілу еритроцитів за їх кислотною стійкістю (метод еритрограмм) складається з фотоелектричній реєстрації зменшення кількості числа еритроцитів у процесі гемолізу (за зменшенням оптичної густини D суспензії клітин), що розвивається під дією розчину соляної кислоти в стабільних умовах [7] (рис.1).

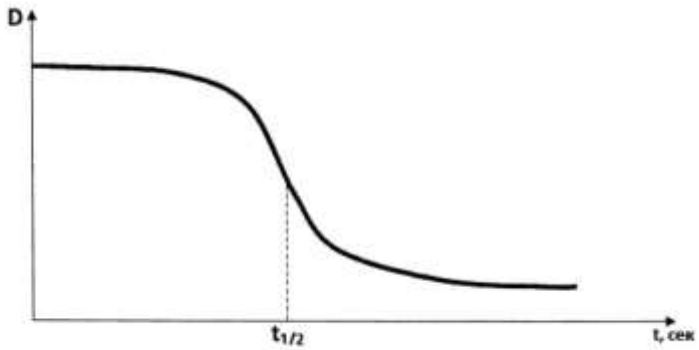

Рис. 1. Крива гемолізу

Для дослідження кінетики гемолізу застосовувався фотоелектричний колориметр типу КФК-2. Знімалася залежність оптичної густини D від часу t. Отримана крива - статистична диференціальна функція розподілу червоних клітин крові за кислотною стійкістю - кислотна еритрограмма [2, 8] (рис. 2).

Встановлено, що найбільш стабільно йде гемоліз, обумовлений простими неорганічними кислотами, кращою є соляна кислота HCl. Час гемолізу знаходиться

в прямій залежності від концентрації кислотного гемолітика. Найбільш прийнятну тривалість гемолізу нормальної людської крові (7 - 8 хв) можна забезпечити шляхом її контакту з 0,012 N розчином HCl.

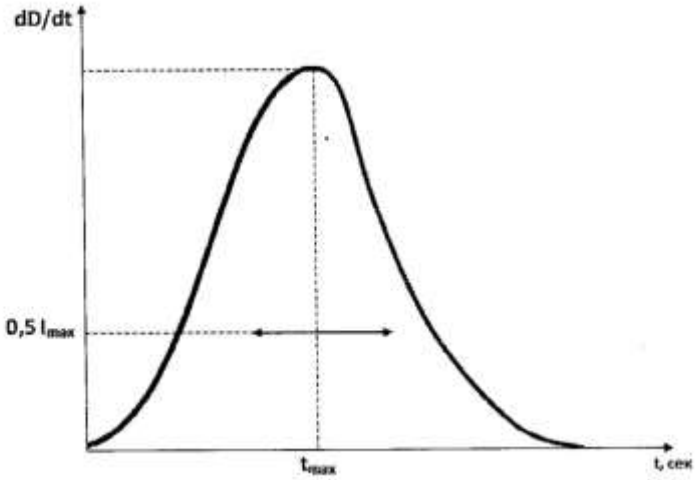

Рис. 2. Диференціальна функція розподілу (S=1)

Для спостереження кислотного гемолізу досить 2 мм^3 крові, яку розводять фізрозчином у відношенні 1: 100. Отримана суспензія еритроцитів придатна для аналізу протягом 3-4 годин при кімнатній температурі. Вимірювання проводяться на установці, основою якої є колориметр фотоелектричний концентраційний (КФК-2) (рис. 3). Використовується промінь світла, пропущений через світлофільтр, з максимумом пропускання на довжині хвилі 670 нм.

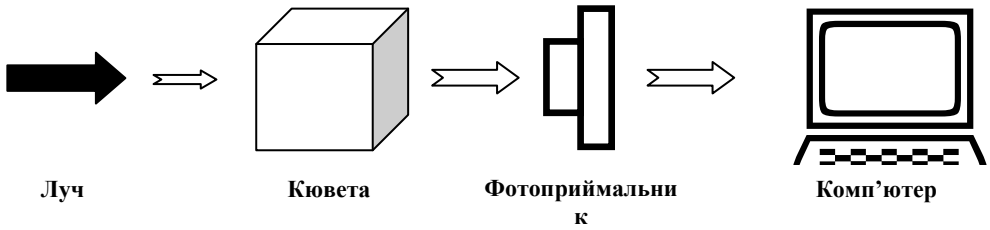

Рис. 3. Схема фотоелектроколориметра КФК-2

У вимірювальну комірку приладу поміщається скляна кювета з фізрозчином; на шкалі колориметра, проградуйованого в одиницях оптичної густини,

встановлюється «нуль». Потім, додаванням суспензії еритроцитів, оптична густина доводиться до значення D = 0,7. Після цього додається розчин HCl. Потім включається комп'ютер, сполучений з колориметром, і протягом 10 - 15 хв записується крива ходу гемолізу еритроцитів.

В основі реєстрованого падіння оптичної густини лежить той факт, що еритроцити мають відмінності в стійкості до гемолізу і залучаються до цього процесу, відповідно їх розподілу за стійкістю. Еритрограмми здорових людей показали, що розподіл еритроцитів за стійкістю у людини в нормі постійний. Максимум припадає на 3 - 4 хв, початок гемолізу - на 2 - 3 хв, кінець - 7 - 9 хв. Крива розподілу асиметрична. При порушенні рівноваги в системі крові виникають відхилення від норми в розподілі еритроцитів за стійкістю. Отримання ряду еритрограмм дозволяє стежити за динамікою якісних змін в системі крові.

При вивченні властивостей еритрограмм: часу напівгемолізу, моди, ширини на напіввисоті, коефіцієнта асиметрії обчислювалося відносне відхилення δ^x «досвіду» від «контролю» (у відсотках) за формулою: $\delta^x = (x-x^0) / x^0$, де x и x^0 – величина одного з параметрів «досвіду» і «контролю», відповідно.

Дослідження методом зустрічного іонного транспорту. Ще одним параметром, за яким визначали рівень біологічної відповіді на вплив світлового опромінення, була швидкість зустрічного переміщення іонів хлору (Cl^-) і гідроксилу (OH^-) через еритроцитарну мембрану. Зустрічний транспорт іонів реалізується при розміщенні еритроцитів в незабуферену ізотонічну середу зі зниженою концентрацією іонів хлору. При цьому відбувається вихід з еритроцитів деякої кількості зазначених іонів через мембрану; натомість, для підтримки електричної рівноваги в клітинах в еритроцити, входять іони гідроксилу. При цьому знижується pH міжклітинного середовища, а оскільки в середовищі відсутній буфер, то зміна концентрації іонів OH^- в точності відповідає зміни концентрації іонів Cl^-. Концентрацію іонів в розчинах вимірювали за допомогою іономіра [3]. Вимірюючи pH середовища водневим електродом іономіра, визначаємо кількість іонів хлору, що залишили еритроцити.

Експеримент виконувався так. Еритроцити донорської крові (2 мл) відмивали в стандартному фізрозчині (0,85 % NaCl) (5 мл). За допомогою центрифугування (3 рази по 15 хв (3000 об/хв)) формувалася еритромаса, яка містилася на льоду. Відбирався фіксований обсяг еритромаси (2 мкл) і вводився в вимірювальну комірку іономіра (типу ЭВ-74), в якій знаходилося 5 мл водного розчину сахарози (0,29 М) - незабуференого середовища. Далі, шляхом вимірювання концентрації іонів водню (величини pH середовища) водневим електродом іономіра (типу ЭСЛ-43-07) визначалась кількість іонів Cl^-, які залишили еритроцити. Кінетику зміни pH середовища реєстрували за допомогою персонального комп'ютера. Типова крива наведена на рис. 4.

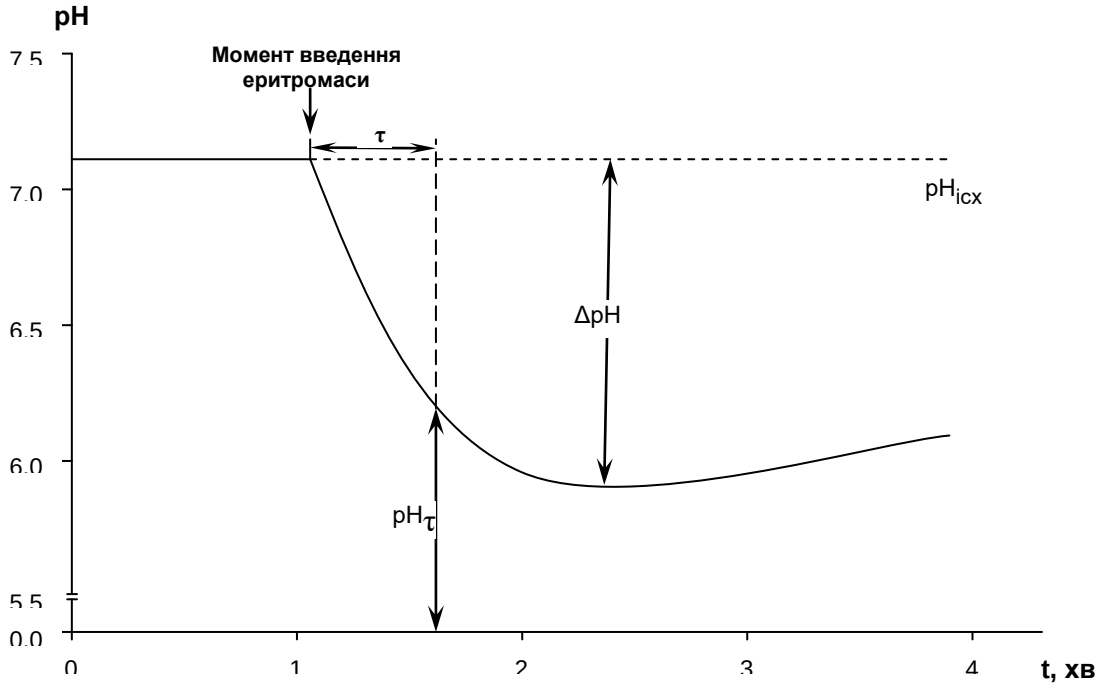

Рис. 4. Крива зміни pH середовища

Відразу ж після введення еритромаси в розчин сахарози в середовищі різко зменшується pH; його значення проходить через мінімум, після чого закислення середовища змінюється зворотним залуженням.

Початкову швидкість закислення можна визначити, вимірюючи час τ, за який відбувається закислення на величину ($1- e^{-1}$) від повної амплітуди ΔpH, тобто за час,

протягом якого значення pH зменшується від стартового значення $pH_{исх}$ до величини $pH_{\tau} = pH_{исх} - \Delta pH(1-e^{-1})$. Швидкість спадання pH дозволяє визначити сумарний (від всіх еритроцитів, що містяться в комірці) потік J іонів Cl^-, обмінюються на сумарний потік іонів OH^-:

$$J = jS. \quad (1)$$

Тут S - сумарна поверхня мембран всіх еритроцитів, що містяться в вимірювальної комірки, а j - поверхнева густина потоку речовини в напрямку x з градієнтом концентрації уздовж цього напрямку dc/dx:

$$j = -D\, dc/dx,$$

де D – коефіцієнт дифузії (закон Фіка). У разі, якщо стаціонарний транспорт йде через тонку мембрану, то похідну dc/dx можна замінити кінцевою різницею концентрацій, віднесеної до товщини мембрани L. Тоді

$$j = -D\Delta c/L = P(c_I - c_{II}). \quad (2)$$

Тут введена проникність мембрани для речовини, що дифундує, P = D / L і конкретизовані концентрації речовини: зліва від мембрани - c_I (відсік I) і праворуч від мембрани - c_{II} (відсік II). У реальній ситуації до мембрани завжди примикає неперемішуваний примембранний шар води, який залишається абсолютно нерухомим навіть при наявності сильного конвективного руху поблизу нього. Перенесення речовини через цей шар здійснюється дифузійним шляхом, тому його прийнято називати примембранним неперемішуваним дифузійним водним шаром.

Розглянемо, слідуючи [6] більш докладно переміщення речовини A (іонів) з відсіку (I) з постійною концентрацією c_I в розчин по іншу сторону мембрани (відсік (II)). Молекули речовини A повинні подолати послідовно три дифузійних бар'єри: перший (за ходом) примембранний шар води завтовшки δ_1 (густина потоку j_{IM}), власне саму мембрану товщиною L (густина потоку j_M) і другий примембранний шар води завтовшки δ_2 (густина потоку j_{MII}).

Відповідно до закону Фіка (2) відповідні густини потоків записуються у вигляді

$$j_{IM} = P_{IM}(c_I - c_{IM});\ j_M = P_M(c_I - c_{IM});\ j_{MII} = P_{MII}(c_{IIM} - c_{II}), \quad (3)$$

де P_{IM}, P_M, P_{MII} - проникності відповідних бар'єрів; c_{IM} і c_{IIM} – концентрації на протилежних сторонах мембрани. У стаціонарному стані густини всіх потоків рівні: $j_{IM} = j_M = j_{MII} = j$.

Оскыльки за (2) $c_I - c_{II} = j/P$, де P – проникність системи в цілому, то

$$P^{-1} = P_{IM}^{-1} + P_M^{-1} + P_{MII}^{-1} \quad (4)$$

Величину P^{-1} можна назвати «опором» потоку речовини. Опори потоку примембранних неперемішуваних шарів пропорційні товщині цих шарів. Дійсно, згідно з визначенням проникності (2):

$$P_{IM}^{-1} + P_{MII}^{-1} = (\delta_1 + \delta_2)/D_w,$$

де D_w – коефіцієнт дифузії молекул речовини А в воді.

Якщо прийняти наближення, що товщини цих примембранних шарів однакові, тобто $\delta_1 = \delta_2 = \delta_D$, маємо

$$P_{IM}^{-1} + P_{MII}^{-1} = 2\,\delta_D/D_w, \quad (5)$$

Підставляючи (5) в (3) з урахуванням того, що $j_M = P_M (c_I - c_{IM}) = D_m L^{-1}(c_I - c_{IM})$, тобто $P_M = D_m L^{-1}$, отримаємо вираз для товщини дифузійного примембранного шару

$$\delta_D = 0{,}5\, D_w(P^{-1} - L/D_m), \quad (6)$$

Тут D_m - коефіцієнт дифузії молекул речовини через ліпідний подвійний шар мембрани товщиною L. Маючи інформацію про параметри D_w, D_m, P і L, можна визначити товщину примембранного шару δ_D. Однак, оскільки в експерименті ми вимірюємо поверхневу густину потоку через все еритроцитарні мембрани в комірці (J = jS), а дані про чисельні значення сумарної поверхні S ми не маємо в своєму розпорядженні, то визначити величину δ_D не можна.

Проте, якщо при виконанні кожного вимірювання J забезпечувати ідентичні умови (включаючи однакову швидкість перемішування рідини в комірці), то можна визначити відношення товщини дифузійного примембранного шару еритроцитів, що не зазнали опромінення ($\delta_D(0)$), до товщини зазначеного шару еритроцитів, що зазнали світлове опромінення ($\delta_D(*)$). Дійсно, можна вважати, що в ході опромінення сумарна поверхня мембран еритроцитів зберігається без змін, тобто S(0) = S(*). Тоді використовуючи рівняння (1) і (2), можна записати

$$J(*)/J(0) = j(*)/j(0) = [D(*)/\delta_D(*)] : [D(0)/\delta_D(0)] = [D(*)/D(0)]\cdot[\delta_D(0)/\delta_D(*)]. \quad (7)$$

Результати досліджень та їх обговорення. *Результати вимірювання методом кислотних еритрограмм.* Були виконані вимірювання кислотних еритрограмм для неопроміненої і опроміненої лазером (λ = 640 нм) і світловипромінювальними діодами: «жовтим» - (λ = 592) нм; «фіолетовим» - (λ = 400 нм); «зеленим» - (λ = 525 нм) (експозиції 15 і 30 хвилин) крові 5 донорів.

Для узагальнення величин змін в параметрах за зразками крові всіх донорів перейшли до порівняння відносних змін часу напівгемолізу ($\delta^{н\text{-}г}$) (часу, протягом якого руйнується половина клітин крові), моди ($\delta^{м}$) (максимуму функції розподілу статистичного ансамблю), ширини на напіввисоті ($\delta^{ш}$) (характеризує ступінь однорідності еритроцитів по їх кислотної стійкості) шляхом відповідного усереднення (табл. 1 – 3).

1. Зміни часу напівгемолізу від експозиції, усереднені за зразками крові всіх донорів

Експозиція τ, хв	15	30
Відносна зміна $t_{1/2}$, $\delta^{Н\text{-}Г} = (t_{1/2} - t^0_{1/2})/ t^0_{1/2}$, %	8,83	13,7

З таблиці 1 випливає, що зі збільшенням тривалості часу опромінення час напівгемолізу монотонно зменшується.

2. Зміна моди в залежності від експозиції, усереднені за зразками крові всіх донорів

Експозиція τ, хв.	15	30
Відносна зміна t_{max}, $\delta^{М} = (t_{max} - t^0_{max})/ t^0_{max}$, %	8,1	11,2

З таблиці 2 випливає, що зі збільшенням тривалості часу опромінення величина переміщення моди в більш «ранню» область монотонно зростає.

3. Зміна ширини функції розподілу еритроцитів (виміряної на напіввисоті) від експозиції, усереднені за зразками крові всіх донорів

Експозиція τ, хв.	15	30
Відносна зміна $\Delta_{1/2}$, $\delta^{Ш} = (\Delta_{1/2} - \Delta^0_{1/2})/ \Delta^0_{1/2}$, %	7,43	13,13

З таблиці 3 випливає, що зі збільшенням тривалості часу опромінення ширина на напіввисоті (характеризує ступінь однорідності еритроцитів по їх кислотної стійкості) монотонно зменшується.

Для проведення порівняльного аналізу впливу типу випромінювача на час напівгемолізу, зібрані усереднені дані за зразками крові всіх донорів. Значення наведені в таблиці 4.

4. Зміна часу напівгемолізу від експозиції і типу випромінювача, усереднені за зразками крові всіх донорів

Експозиція τ, хв.	Типи випромінювача	15	30
Відносна зміна $t_{1/2}$, $\delta^{П-Г} = (t_{1/2} - t^0_{1/2})/ t^0_{1/2}$, %	Лазер (λ=640 нм)	5,5	15,2
	«Фіолетовий» світлодіод (λ=400 нм)	10.2	12.3
	«Зелений» світлодіод (λ=525 нм)	7,6	12
	«Жовтий» світлодіод (λ=592 нм)	12	15,3

З таблиці 4 видно, що зі збільшенням тривалості часу опромінення час напівгемолізу зменшується; відносна зміна збільшується.

Очевидно, що найбільш ефективно впливає на еритроцити «жовтий» світлодіод. За ним по ефективності слідує лазер, «фіолетовий» і «зелений» світлодіоди.

Отримані результати відповідають добре відомим уявленням про перенесення молекул через клітинну мембрану, викладеним в [5, 6]. Величина потоку молекул через мембрану обернено пропорційна товщині мембрани. Оскільки в реальних умовах шари водного розчину, що безпосередньо прилягають до мембрани, практично не перемішуються (так звані неперемішувані (дифузійні) шари Нерста), то і концентрації молекул, що дифундують до мембрани в цих шарах істотно

відрізняються від концентрації аналогічних молекул в об'ємі, що залишився (на свідомо великій відстані від клітини). Сукупність мембрани з дифузійними шарами можна розглядати як ефективну мембрану, товщину якої прийнято визначати за формулою:

$$L_{еф} = L_{мембр} + \Delta X_{внутр} + \Delta X_{зовніш},$$

де $\Delta X_{внутр}$ и $\Delta X_{зовніш}$ – товщини неперемішуваних (дифузійних) водних шарів з внутрішньої і зовнішньої сторони мембрани відповідно.

Застосування методу кислотних еритрограмм передбачає введення в суспензію клітин крові розчину HCl. Молекули HCl дифундують до мембрани крізь неперемішуваний примембранний водний шар, контактують з мембраною, руйнуючи її. Молекули кислоти за більш короткий час приходять до мембрани, ніж тоді, коли суспензія не зазнала опромінення, гемоліз в опромінених клітинах починається раніше. Раніше було показано, що чотирихвилинне опромінення селективним освітленням спектральної лінії ртутної лампи λ = 577,0 нм (видима жовта лінія) дає зменшення товщини примембранного дифузійного водного шару в (1,21 ± 0,06) рази (з видимої області ця лінія найбільш ефективна) [1]. Цей результат корелює з тим, що час напівгемолізу еритроцитів, опромінених «жовтим» світлодіодом менше, ніж час напівгемолізу еритроцитів, опромінених іншими світловими джерелами. Цей і вищевикладені результати змушують припустити, що промені світлового діапазону (світлодіод і лазер) зменшують товщину примембранного водного шару.

Результати, що отримані методом зустрічного транспорту іонів. Були виконані вимірювання неопроміненої і опроміненої світловими джерелами: лазером (λ = 640 нм), «фіолетовим» світлодіодом (λ = 400 нм), «зеленим» світлодіодом (λ = 540 нм), «жовтим» світлодіодом (λ = 592 нм) крові від 4 донорів.

Вимірювання показали, що, хоча індивідуальні значення обмінних потоків J (тобто зустрічного транспорту - іонів Cl^- /OH^-) у зразків, отриманих від різних донорів різнилися в певних межах, проте у всіх зразках потоки через опромінені клітини перевищували потоки через неопромінені клітини. Отримано, що в

результаті тридцятихвилинного опромінення відношення величин потоків, усереднених за 4 донорами, дорівнює

$$J(*)/J(0) = 1{,}22 \pm 0{,}06. \quad (8)$$

Отже, згідно з (7),

$$[D(*)/D(0)] \cdot [\delta_D(0)/\delta_D(*)] = 1{,}22. \quad (9)$$

В отримане співвідношення входять як коефіцієнт дифузії, так і товщина дифузійного шару. Немає підстав вважати, що в ході низькоінтенсивного світлового опромінення змінилося значення коефіцієнта дифузії. Прийнявши $D(0) = D(*)$ в (9), маємо $\delta_D(*) = 0{,}82\ \delta_D(0)$, тобто виявляється, що товщина дифузійного прикордонного шару зменшилася завдяки низькоінтенсивному світловому опроміненню в $(1{,}22 \pm 0{,}06)$ рази.

Цей результат корелює з результатом, отриманим при вимірюванні товщини дифузійного шару методом парамагнітного допінгу, де показано, що після тридцятихвилинного опромінення еритроцитів гелій-неоновим лазером (λ = 632,8 нм) товщина дифузійного прикордонного шару зменшилася в $(1.17 \pm 0{,}06)$ рази [4].

Отримано, що в результаті світлового опромінення примембранний дифузний водний шар стає тоншим і для дифузії молекул води і для дифузії іонів (Cl^- и OH^-). Це дає підставу стверджувати, що зменшення товщини зазначеного шару призводить до прискорення перенесення і інших речовин, наприклад, молекул O_2 через мембрану еритроцита. Відповідно, в живому організмі при опроміненні крові хвилями світлового діапазону (або відразу після припинення опромінення) в одиницю часу обмін речовин між еритроцитами і міжклітинним середовищем відбувається більш інтенсивно.

Розглянемо фізичний механізм, завдяки якому світлова енергія лазерного і світлодіодного випромінювання забезпечує появу біологічної відповіді. Оскільки товщина дифузійного примембранного шару на кілька порядків більше товщини ліпідного шару мембрани, практично увесь час, що витрачається молекулами на дифузійний рух в клітину, йде на подолання примембранного водного шару.

Світлове випромінювання сприяє зменшенню ефективної товщини зазначеного шару. У цьому процесі беруть участь повітряні бульбашки. Відомо, що в біологічній рідині міститься розчинене повітря і повітря в бульбашках [4]. Бульбашки, що знаходяться в біотканині, присутні і в дифузійному примембранном водному шарі. Рухаючись в примембранному шарі, бульбашки грають роль своєрідних «перемішувачів». Під дією світлового випромінювання повітряні бульбашки збільшуються в розмірах. Оскільки швидкість переміщення бульбашки більшого радіусу більша, ніж швидкість бульбашки з меншим радіусом, то бульбашки, що збільшились, рухаються в примембранному водному шарі швидше. Через це реалізується більш активне перемішування зазначеного шару; «ефективна» товщина його стає менше, ніж була до опромінення світловим випромінювачем. Процес перенесення іонів в клітину (і з клітини) та інші процеси обміну речовин в системі «клітина-міжклітинне середовище» йдуть швидше. Очевидно, завдяки низькоінтенсивному світловому опроміненню ефективна проникність системи «клітинна мембрана плюс примембранной водний шар» збільшується.

Висновки і перспективи. 1. Отримано, що опромінення зразків крові низькоінтенсивним лазером (λ = 640 нм), «фіолетовим» світлодіодом (λ = 400 нм), «зеленим» світлодіодом (λ = 540 нм), «жовтим» світлодіодом (λ = 592 нм) призводить до зменшення часу напівгемолізу, що відбувається при введенні кислоти в суспензію крові. Зі збільшенням тривалості опромінення час напівгемолізу монотонно зменшується.

2. Низькоінтенсивне лазерне випромінювання (λ = 640 нм), випромінювання «фіолетового» світлодіода (λ = 400 нм), «зеленого» світлодіода (λ = 540 нм), «жовтого» світлодіода (λ = 592 нм) збільшує швидкість зустрічного переміщення іонів через еритроцитарні мембрани.

3. Зменшення часу напівгемолізу і збільшення швидкості зустрічного перенесення іонів опромінених зразків крові обумовлено зменшенням «ефективної» товщини примембранного дифузійного шару.

4. Отримано. що опромінення зразків крові «жовтим» світлодіодом (λ = 592 нм) впливає на еритроцити в більшій мірі, ніж інші випромінювачі. Цей результат корелює з даними, отриманими методом ЯМР, де було показано, що чотирихвилинне опромінення селективним освітленням спектральної лінії ртутної лампи λ = 577,0 нм (видима жовта лінія) дає зменшення товщини примембранного дифузійного водного шару в (1,21 ± 0,06) рази (на 18%) [1].

5. Отримано, що опромінення крові низькоінтенсивним лазером (λ = 640 нм) впливає на еритроцити в наступному ступені після «жовтого» світлодіода (λ = 592 нм). Цей результат корелює з даними, отриманими методом ЯМР, де було показано, що після тридцятихвилинного опромінення еритроцитів гелій-неоновим лазером (λ = 632,8 нм) товщина дифузійного прикордонного шару зменшилася в (1.17 ± 0,06) рази (на 15 %) [4].

Отже дані, отримані за впливом ЕМВ оптичного діапазону на примембранний водний шар еритроцитів, виміряний трьома біофізичними методами, збігаються. Зменшення «ефективної товщини» примембранного водного шару змінює швидкість обмінних процесів у системі «клітина - міжклітинна середовище», тим самим змінюючи режим функціонування клітини. Змінений режим функціонування є біологічною відповіддю на вплив всіх випромінювачів, а особливо на опромінення діапазонами довжин хвиль 570-590 нм і 630 -640 нм. Клітини крові зі зміненим режимом функціонування, є сигналами-подразниками, які змушують організм мобілізувати ресурси на боротьбу з патологією. Ці обставини можуть прогнозувати створення універсальної фототерапевтичної апаратури для екстракорпорального опромінення крові на базі світлодіодів з певними параметрами впливу, зокрема з певним ефективним діапазоном довжин хвиль.

Список використаних джерел

1. Алмазова Е. Б., Емец Б. Г. О механизме влияния излучения газоразрядной ртутной ультрафиолетовой лампы на толщину примембранного водного слоя эритроцитов человека. Біофізичний вісник. 2008. Вип. 21 (2). С. 88-94.

2. Буйлин В. А., Брехов Е. И., Ларюшин А. И. и др. Лазеро- и светотерапия облитерирующих заболеваний нижних конечностей. Лазерная медицина. 2002. №6 (3). С. 4 - 6.

3. Васильев Н. Е. Лазерная медицина. 2000. Т.3 (3-4). С.16-20.

4. Емец Б. Г. Эффекты взаимодействия низкоинтенсивных электромагнитных волн с наноразмерными газовими включениями в жидких средах. Диссертация на соискание ученой степени доктора физико-математических наук. Харьков,2004. 336 с.

5. Кару Т. Й. Первичные и вторичные клеточные механизмы лазерной терапии. Низкоинтенсивная лазерная терапия. М.: ТОО «Фирма «Техника», 2000. С.71-94.

6. Котык А., Яначек К. Мембранный транспорт. М.: Мир, 1980. 338 с.

7. Терсков И. А., Гительзон И. И. Метод химических (кислотных) эритрограмм. Биофизика. 1957. Т.2, № 2. С.259-266.

8. Толстых П. А., Карабоев У. Г., Шехтер А. М. Лазерная медицина. 2001. № 5 (2). С.8-13.

References

1. Almazova, E. B., Yemets, B. G. (2008). O miekhanizme vliianiia izluchieniia gazorazriadnoi rtutnoi ultrafiolietovoi lampy na tolshchinu primiembrannogo vodnogo sloia eritrotsitov chieovieka. Biofizychnyi visnyc [On the mechanism of the influence of radiation from a gas-discharge mercury ultraviolet lamp on the thickness of a near-membrane water layer of human red blood cells], 21(2), 88-94.

2. Builin, V. A., Briekhov Ye. I., Lariushin A. I. (2002). Laziero- i svietotierapiia oblitieriruiushchikh zabolievanii nizhnikh koniechnostiei [Laser and light therapy of obliterating diseases of the lower extremities]. Laziernaia mieditsina, 6 (3), 4 – 6.

3. Vasiliev, N. E. (2000). Laziernaia mieditsina [Laser medicine]. Vol. 3 (3-4), 16-20.

4. Yemets, B. G. (2004). Effiekty vzaimodieistviia nizkointiensivnykh eliektromagnitnykh voln s nanorazmiernymi gazovymi vkliuchieniiami v zhidkikh sriedakh [Effects of the interaction of low-intensity electromagnetic waves with nanoscale gas inclusions in liquid media]. Thesis for the degree of Doctor of Physics and Mathematics. Kharkov, 336.

5. Karu, T. Y. (2000). Piervichnyie I vtorichnyie klietochnyie miekhanizmy laziernoi tierapii. Nizkointensivnaia laziernaia tierapiia [Primary and secondary cellular mechanisms of laser therapy. Low-intensity laser therapy]. Moskow: TOO «Firma «Tiekhnika», 71-94.

6. Kotyk, A., Janacek, K. (1980). Miembrannyi transport [Membrane transport]. Moskow: Mir, 338.

7. Terskov, I. A., Gitielzon, I. I. (1957). Mietod khimichieskikh (kislotnykh) eritrogramm [The method of chemical (acid) erythrograms]. Biofizika, 2 (2), 259-266.

8. Tolstykh, P. A., Karaboyev, U. G., Shekhter, A. M. (2001). Laziernaia mieditsina, 5 (2), 8-13.

КОГЕРЕНТНОЕ И МОНОХРОМАТИЧЕСКОЕ ИЗЛУЧЕНИЕ ИЗМЕНЯЮТ ВРЕМЯ ГЕМОЛИЗА ЭРИТРОЦИТОВ, А ТАКЖЕ СКОРОСТЬ ВСТРЕЧНОГО ПЕРЕНОСА ИОНОВ ЧЕРЕЗ ЭРИТРОЦИТАРНУЮ МЕМБРАНУ

Е. Б. Алмазова, Н. Л. Лисиченко

Аннотация. *Эритроциты последовательно облучали низкоинтенсивным лазером (λ = 640 нм), «фиолетовым» светодиодом (λ = 400 нм), «зеленым» светодиодом (λ = 540 нм), «желтым» светодиодом (λ = 592 нм). Методом кислотных (химических) эритрограмм и методом встречного транспорта сравнивали кинетические характеристики в облученных и необлученных образцах крови.*

Получено: - методом кислотных эритрограмм обнаружено, что в облученных образцах крови происходит уменьшение времени полугемолиза;

- низкоинтенсивное лазерное излучение, а также излучение светодиодов увеличивают скорость встречного переноса ионов через эритроцитарные мембраны.

- уменьшение времени полугемолиза и увеличение скорости встречного переноса ионов, облученных образцов крови, обусловлено уменьшением «эффективной» толщины примембранного диффузионного слоя – неперемешиваемого слоя воды, примыкающего к мембране эритроцита.

Уменьшение «эффективной толщины» примембранного водного слоя (минимален в диапазоне длин волн 570-590 нм и 630- 640 нм) изменяет скорость обменных процессов в системе «клетка – межклеточная среда», изменяя режим функционирования клетки. Измененный режим функционирования - биологический ответ на световое излучение. Красные клетки крови с измененным режимом функционирования, представляют собой сигналы-раздражители, заставляющие организм мобилизовать ресурсы на борьбу с патологией. Данные обстоятельства могут прогнозировать создание универсальной фототерапевтической аппаратуры для экстракорпорального облучения крови на базе светодиодов с определенными параметрами воздействия.

Ключевые слова: ***эритроцит; образцы крови, облученные низкоинтенсивным лазером; облученные светодиодами, метод кислотных (химических) эритрограмм, примембранный диффузионный слой***

COHERENT AND MONOCHROMATIC IRRADIATION CHANGES THE ERYTHROCYTE HEMOLYSIS TIME AND THE SPEED OF THE ION COUNTER TRANSPORT THROUGH THE ERYTHROCYTE MEMBRANE

O. B. Almazova, M. L. Lysychenko

Abstract. *The erythrocytes of human blood were sequentially irradiated with a low-intensity laser (λ = 640 nm), a violet LED (λ = 400 nm), a green LED (λ = 540 nm), and a yellow LED (λ = 592 nm). The method of acid (chemical) erythrograms and the method of counter ion transport compared the kinetic characteristics in irradiated and unirradiated blood samples.*

Received: - by the method of acid erythrograms it was found that in the irradiated blood samples there is a decrease in the time of hemolysis;

- low intensity laser radiation, as well as the emission of LEDs, increase the rate of counter ion transport through red blood cells.

- a decrease in the time of hemolysis and an increase in the rate of counter ion transport of irradiated blood samples is due to a decrease in the "effective" thickness of the near-membrane diffusion layer - an immiscible layer of water adjoined to the erythrocyte membrane.

A decrease in the "effective" thickness of the near-membrane water layer (minimal in the wavelength range of 570-590 nm and 630-640 nm) changes the rate of metabolic processes in the "cell - intercellular medium" system, changing the mode of cell functioning. The altered mode of functioning is a biological response to light radiation. Red blood cells with an altered mode of functioning are signals - stimuli that cause the body to mobilize resources to fight pathology. These circumstances can predict the creation of a universal phototherapeutic equipment for extracorporeal blood irradiation based on light-emitting diodes with certain exposure parameters.

Key words: ***erythrocyte, blood samples irradiated with a low-intensity laser, irradiated with LEDs, acid (chemical) erythrograms, near-membrane diffusion layer***