



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41098 (13) A

(51) 7 G01N33/49, G01N21/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КОЕФІЦІЄНТА ПРОНИКНОСТІ ЕРИТРОЦИТІВ ДЛЯ ЕЛЕКТРИЧНО НЕЙТРАЛЬНИХ РЕЧОВИН

(21) 2001020892

(22) 09.02.2001

(24) 15.08.2001

(46) 15.08.2001, Бюл. № 7, 2001 р.

(72) Гордієнко Євген Олександрович, Гордієнко Ольга Іванівна, Гордієнко Юлія Євгенівна, Коваленко Ігор Федорович

(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб визначення коефіцієнта проникності еритроцитів для електрично нейтральних речовин,

що включає вміщення еритроцитів у розчин електрично нейтральної речовини і визначення часу 50% гемолізу з подальшим розрахунком коефіцієнта проникності за допомогою теоретично розрахованої залежності часу 50% гемолізу від коефіцієнта проникності, який **відрізняється** тим, що час 50% гемолізу визначають за інтенсивністю розсіяного клітинною суспензією світла, а коефіцієнт проникності розраховують за допомогою теоретичної залежності, що враховує тривалість процесу гемолізу після досягнення клітиною критичного об'єму.

Винахід належить до клітинної біології і може бути використаний для оцінки стану бар'єрно-транспортної функції мембран еритроцитів.

Відомим є спосіб визначення коефіцієнта проникності (K) еритроцитів для електрично нейтральних речовин (ЕНР) [1]. Згідно з цим способом еритроцити вміщують в ізо- або гіпертонічний розчин проникаючої ЕНР, через задані проміжки часу відбирають проби і центрифугують. В надосадковій рідині визначають кількість гемоглобіну і з одержаної залежності знаходять час 50% гемолізу. Далі розраховують зміну об'єму еритроциту у часі за рівнянням Кедем-Качальського [2] при різних значеннях K. Значення фігуруючого в рівняннях [2] K, при якому розрахований час досягнення клітинами критичного об'єму, збігається з експериментально визначеним часом 50% гемолізу, вважається шуканою величиною.

Основним недоліком цього способу є неточність у визначенні K. Це пов'язано, по-перше, з тим, що процедура центрифугування вносить похибки в часову залежність при визначенні часу 50% гемолізу. По-друге, величина критичного об'єму вважається відомою, заздалегідь заданою величиною, хоча за даними різних авторів вона складає від 150% до 215% від початкового значення. Таким чином, довільний вибір значення критичного об'єму з цього інтервалу значень також є джерелом помилок. По-третє, як показують наші дослідження [3, 4], критичний об'єм еритроциту, при якому починається його гемоліз, не є фіксованою величиною, а залежить як від значення ви-

мірюваної величини K, так і від осмотичного тиску позаклітинного розчину. Нарешті, час 50% гемолізу безпосередньо не є пов'язаним з часом досягнення клітинами об'єму, при якому починається гемоліз. Ці величини можуть багаторазово відрізнятися, оскільки процес виходу гемоглобіну з еритроцитів відбувається впродовж скінченного проміжка часу, а не миттєво. При цьому час 50% гемолізу завжди перевищує час досягнення клітинами критичного об'єму, при якому починається гемоліз. Отже, значення K для ЕНР, які вимірюються таким способом, є заниженими. Окрім того, спосіб є трудомістким і не може бути використаним для визначення K для речовин, що швидко проникають в клітини, оскільки включає низку тривалих маніпуляцій (відбір проб, центрифугування, визначення гемоглобіну в надосадку).

Задачею винаходу є створення такого способу визначення K еритроцитів для ЕНР, котрий би за рахунок зміни методу вимірювання часу 50% гемолізу і використання теоретичної залежності часу 50% гемолізу від K, що відображає дійсний механізм гемолізу, забезпечував підвищення точності визначення K.

Ця задача вирішується тим, що в способі визначення K еритроцитів для ЕНР, що включає вміщення еритроцитів у розчин ЕНР і визначення часу 50% гемолізу з наступним розрахунком K за допомогою теоретично розрахованої залежності часу 50% гемолізу від K, час 50% гемолізу еритроцитів визначають за інтенсивністю розсіяного клітинною суспензією світла, а K розраховують за допомогою

теоретичної залежності $t_{1/2}(K)$, яка враховує тривалість процесу гемолізу після досягнення клітиною критичного об'єму [3, 4].

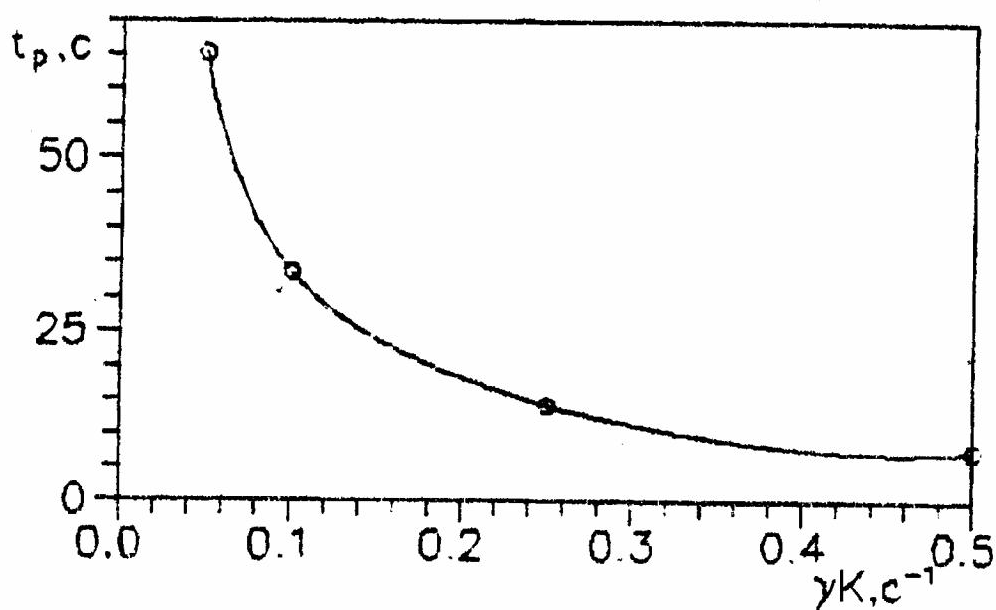
Використання методу малокутового розсіювання світла для вимірювання часу 50% гемолізу і розрахунок K з урахуванням тривалості процесу гемолізу після досягнення клітиною критичного об'єму забезпечує підвищення точності визначення K . На рисунках подані залежності часу t_p (фіг. 1), при якому починається гемоліз еритроцитів людини в 1М розчині проникаючої в клітини ЕНР, і часу $t_{1/2}$ (фіг. 2), за який з клітин виходить 50% гемоглобіну, від шуканого K (γ -поверхнево-об'ємне відношення, яке становить $1,314 \cdot 10^6$ 1/м). При визначенні K в прототипі вважається, що t_p збігається з $t_{1/2}$, хоча, як впливає із порівняння цих залежностей, ці часи значно відрізняються. Так, наприклад, якщо фактично виміряний час 50% гемолізу є 10 с, то спосіб вимірювання за прототипом дає $K = 2,57 \cdot 10^{-7}$ м/с, а наш спосіб вимірювання — $K = 4,19 \cdot 10^{-7}$ м/с. Таким чином, відомий спосіб вимірювання K призводить до похибки 60%. При нижчих значеннях K ця похибка зменшується, та все ж таки залишається значною. Так, якщо фактично виміряний час 50% гемолізу є 90 с, то відомий спо-

сіб вимірювання дає значення K на 30% менше, ніж значення K , визначене за допомогою способу, який ми пропонуємо.

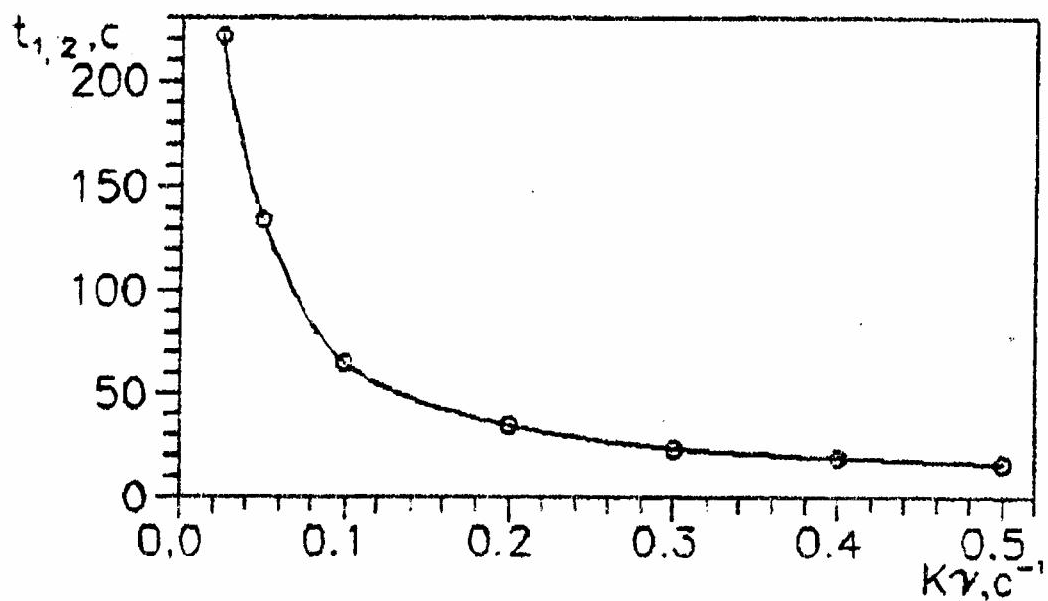
Додатковою перевагою нашого способу є те, що він не містить трудомістких операцій і може бути використаний для визначення K як для повільно, так і для швидко проникаючих ЕНР.

Приклад здійснення способу.

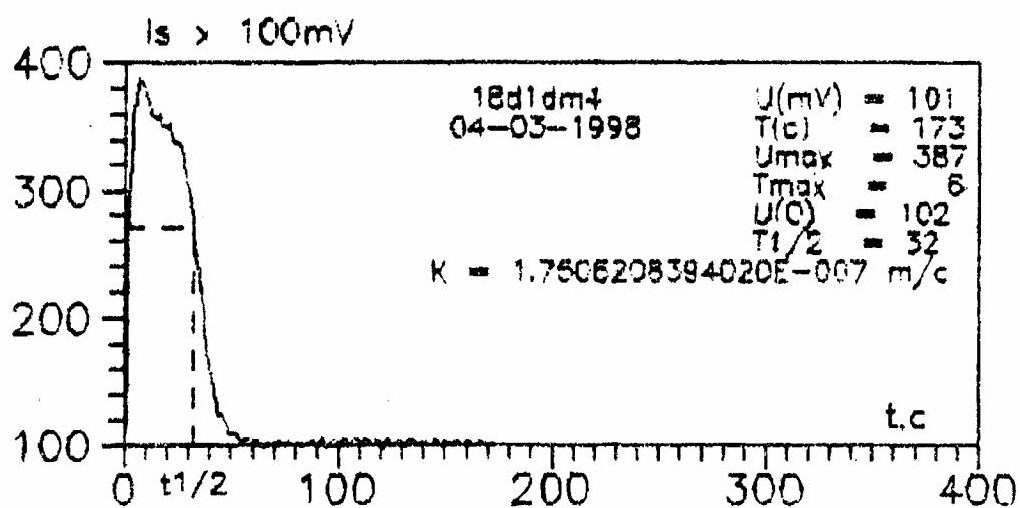
3 мл 1М водного розчину диметилсульфоксиду (ДМСО) наливають в оптично прозору кювету, яку вміщують в камеру приладу для вимірювання інтенсивності малокутового розсіювання світла [5]. 5 мкл донорської крові додають у розчин ДМСО в нульовий момент часу і реєструють величину сигналу, що є пропорційним до інтенсивності розсіяного клітинною суспензією світла з довжиною хвилі 1 мкм під кутом 9° до напрямку падаючого пучка впродовж 3–10 хвилин. За одержаною кривою (фіг. 3) визначають час 50% гемолізу ($t_{1/2} = 32$ с). Далі за одержаним значенням $t_{1/2}$ визначають величину шуканого коефіцієнта проникності за теоретично розрахованою залежністю $t_{1/2}(K)$, що враховує тривалість процесу гемолізу після досягнення клітиною критичного об'єму (фіг. 2) ($K\gamma = 0,23$; $K = 1,75 \cdot 10^{-7}$ м/с).



Фіг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3

Тираж 50 экз.

Відкрите акціонерне товариство «Патент»
 Україна, 88000, м. Ужгород, вул. Гагаріна, 101
 (03122) 3 – 72 – 89 (03122) 2 – 57 – 03

