



•Փորձարարական և տեսական հոդվածներ• Экспериментальные и теоретические статьи•
•Experimental and Theoretical articles•

Биолог. журн. Армении, 4 (60), 2008

АНАЛИЗ КИНЕТИКИ ГЕМОЛИЗА С ПРИМЕНЕНИЕМ ЦЕНТРАЛЬНЫХ МОМЕНТОВ СЛУЧАЙНОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ

А.Ф. АМБАРЦУМЯН, А.Р. СУКИАСЯН, А.А. КИРАКОСЯН

*Государственный инженерный университет Армении,
Департамент химических технологий и природоохранной инженерии,
Ереван*

Предложен метод расчета числовых характеристик распределения эритроцитов по их резистентности, на основании которых можно проводить сравнения эритрограмм. Метод опробован на примере выявления различий между эритрограммами свежей и инкубированной крови.

Эритрограмма - кинетика гемолиза - распределение по резистентности

Առաջարկված է էրիթրոցիտների բաշխվածության թվային բնութագրերի հաշվարկման մեթոդ ըստ նրանց դիմադրողականության, ինչի հիման վրա կա-րելի է իրականացնել էրիթրոցրամների համեմատություն: Մեթոդը կիրառված է թարմ և ջերմամշակված արյան էրիթրոցրամների տարբերությունների բացահայտման օրինակի վրա:

*Էրիթրոցրամ – հեմոլիզի կինետիկա - բաշխվածություն ըստ
դիմադրողականության*

The method of calculation of the date character of the erythrocyte distribution by its resistance for comparison of erythrogramms was proposed. That method will be tested for determination of distribution between erythrogramms both bloods fresh and thermotread.

Erythrogram – hemolysis kinetics - distribution by resistance

Процесс гемолиза можно рассматривать как взаимодействие полимерной мембраны эритроцита с растворенным в жидкой фазе гемолитиком. Это позволяет применять для их анализа известные в химической кинетике дифференциальные уравнения скоростей конкурирующих процессов: диффузии и химической реакции. Решение этих уравнений при различных начальных и граничных условиях были рассмотрены еще Франк-Каменецким [11].

Приводимые им решения представляют собой гиперболические тригонометрические зависимости концентраций продукта от толщины мембраны, времени взаимодействия и концентрации реагента. В качестве приложения этих решений для определения скорости окисления полимерных мембран применительно к скоростям, отнесенным как к единице поверхности, так и к единице массы пленки использовался гиперболический тангенс [14]. Та же функциональная связь была использована при описании асимптоты осмотического лизиса эритроцитов [16, 18]. При этом другими авторами были предложены иные подходы для математического описания кинетики гемолиза [5, 6, 8, 10, 12, 13, 15, 17].

Факторы, влияющие на резистентность мембраны эритроцитов, независимы или слабо зависимы друг от друга. Таковыми могут быть наличие нарушений гемопоэза у донора, наличие эндо- и экзотоксинов в организме, температура тела и многое другое. Влияние каждого из этих факторов на резистентность мембран эритроцитов подчинено отдельной закономерности, но число их достаточно велико. Это позволяет считать распределение долей эритроцитов по продолжительности их “сопротивления” воздействию лизис-фактора случайным, согласно теореме Ляпунова [7]. Тогда числовые характеристики случайного распределения не только позволяют проводить сравнения между большим количеством кинетических кривых распада эритроцитов, но и посредством критериев достоверно оценивать резистентность эритроцитарных мембран.

Целью представленной работы является проверка применимости числовых характеристик функции распределения случайной величины при математическом описании эритрограмм для статистически достоверного установления средней продолжительности гемолиза эритроцитов, количественной оценки однородности популяций последних относительно их способности сопротивляться воздействию лизис-фактора.

Материал и методика. В качестве объекта исследований использовалась свежая донорская кровь клинически здоровых женщин в возрасте 36-40 лет. Забор крови осуществляли из пальца. Для проведения исследований каждый образец крови разделялся на две части: одну часть тут же подвергали гемолизу, а вторую – инкубировали в течение 30 мин в ультратермостате марки U-15 при $37 \pm 0,2^\circ$. Ход кислотного гемолиза регистрировали по мутности суспензии в красном свете (670 нм) с использованием фотоколориметра типа КФК-2 по [2] при $+20^\circ$. Изменение оптической плотности регистрировали через каждые 30 с в течение гемолиза. В качестве контроля принимали ту же не подвергнутую инкубированию кровь. Расчет доли эритроцитов %Э, распавшихся за промежуток времени τ , проводили по формуле:

$$\%Э = \frac{D_i - D_{i+1}}{D_0 - D_\infty} \cdot 100\%,$$

где D - оптическая плотность, D_0 и D_∞ - ее исходные и конечные значения, i – порядковый номер измерения.

Расчеты асимметрии и эксцесса проводили с помощью MatLab по методике, разработанной авторами [9], поскольку прочие операционные системы (Microsoft Excel, Linux и т.д.) не позволяют получать точность вычислений.

Результаты и обсуждение. Полученные экспериментальные результаты представлены на рис. 1 в виде эритрограмм распределения долей эритроцитов во времени. Для математического описания кинетики распада эритроцитов мы применили экспоненциальную функцию – распределение случайной величины [1]:

$$F(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^{\tau} \exp\left(-\tau^2/2\right) d\tau,$$

где τ - время распада некоторой доли эритроцитов.

Это распределение наиболее полно разработано теоретически, что позволяет проводить простые расчеты его числовых характеристик. Так, применяли известные формулы расчета начальных моментов распределения [3]

$$m_{\tau} = \int_{-\infty}^{\infty} \tau^k f(\tau) d\tau,$$

где $f(\tau) = \Phi'(\tau)$ при условии непрерывности и дифференцируемости $\Phi(\tau)$, k – степень момента, которую можно рассчитать в начальный момент первого порядка – математическое ожидание ($\bar{\tau}$); а также центральные моменты:

$$\mu_k = \int_{-\infty}^{\infty} (\tau - m_{\tau})^k f(\tau) d\tau.$$

Пользуясь центральными моментами первых четырех порядков ($k \leq 4$), рассчитывали коэффициент асимметрии

$$\rho = \frac{\mu_3}{\mu_2^{3/2}}$$

и коэффициент эксцесса

$$\varepsilon = \left(\frac{\mu_4}{\mu_2^2} \right) - 3.$$

Алгоритмы расчета величин $\bar{\tau}$, ρ и ε приводятся в [3].

Очевидно, что смещение математического ожидания (начальный момент первого порядка μ_1) характеризует изменение брутто-скорости лизиса. Рост значений коэффициента асимметрии (начальный момент второго порядка μ_2) численно характеризует уменьшение, по сравнению с контрольным замером, долей эритроцитов с клеточной мембраной, наименее устойчивой к данному воздействию (например, к изменению температуры среды содержания).

Как можно легко заметить по кривым, приведенным на рис. 1, значение среднего времени лизиса эритроцитов свежей крови визуально оценивается в 4,5 мин, а после инкубирования - 3,4 мин. Однако расчетные значения средних времен распада эритроцитов свежей и инкубированной крови составляют соответственно $\tau_{св} = 4,9 \pm 0,3$ и $\tau_{инк} = 3,6 \pm 0,2$ мин, приведенные доверительные интервалы рассчитаны по [3]. Уменьшение значения математического ожидания времени лизиса ($\tau_{св} > \tau_{инк}$) свидетельствует о наличии ожидаемого уменьшения резистентности оболочек эритроцитов при инкубировании. При этом визуально наблюдаемое положение отличается от зна-

чения средней продолжительности лизиса, поскольку данное положение максимума характеризует время достижения максимальной скорости распада, а не среднюю продолжительность процесса. Следовательно, определение начального момента первого порядка распределения долей эритроцитов по временам распада позволило точно охарактеризовать изменение средней скорости лизиса.

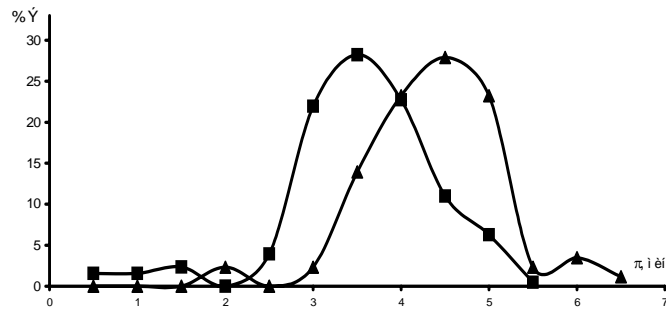


Рис.1. Эритрограммы свежей (▲) и инкубированной (■) крови, усредненные для 16 доноров.

На рис. однозначно заметно смещение обоих распределений в сторону более высоких значений времени сопротивления распаду. Эта тенденция, выраженная численно путем определения коэффициентов асимметрии, указывает на почти четырехкратное увеличение абсолютных значений асимметричности распределения (табл. 1.).

В нашем случае, когда эритрограммы были построены для той же крови в свежем состоянии и после инкубирования, такое увеличение значения коэффициента асимметрии указывает на значительно более высокую резистентность изначально высокостойкой фракции в популяции эритроцитов к воздействию инкубирования. Примечательно, что сохранение стойкости происходит при заметном увеличении брутто-скорости лизиса, охарактеризованной величинами $\tau_{св}$ и $\tau_{инк}$.

Таблица 1. Числовые характеристики распределения долей эритроцитов по резистентности, усредненные для 16 доноров

Величина	Кровь	
	свежая	инкубированная
Среднее время распада эритроцитов (τ), мин	4,87	3,55
Доверительный интервал среднего времени ($\Delta \bar{\tau}$), мин	0,29	0,23
Коэффициент асимметрии распределения (ρ)	- 0,245	- 0,952
Коэффициент эксцесса распределения (ϵ)	1,19	2,07

Полученные нами эритрограммы (рис. 1) визуально не обладают заметным эксцессом. В то же время рассчитанные положительные значе-

ния коэффициента эксцесса $\varepsilon_{\text{св}} = 1,19$ и $\varepsilon_{\text{инк}} = 2,07$ однозначно указывают на наличие “заостренности” распределения, причем инкубирование приводит к почти двухкратному увеличению значения ε . Такое увеличение свидетельствует о росте однородности популяций по отношению к воздействию водородных ионов, имеющему место после инкубирования.

Таким образом, предлагаемый математический подход позволил численно охарактеризовать разницу кривых распределения эритроцитов по их сопротивлению воздействию лизис-фактора в естественно ожидаемом экспериментальном случае. Сравнение числовых характеристик эритрограмм, проводимое по предложенной математической интерпретации, открывает возможность обработки большого числа экспериментальных данных о скорости распада клеточных мембран, а также хранения больших массивов информации по кинетике гемолиза.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ахназарова С.Л., Кафаров В.В.* Оптимизация эксперимента в химии и химической технологии. М.: Высшая школа, 319 с., 1978.
2. *Гительзон И.И., Терсков И.А.* Эритрограммы как метод клинического исследования крови. Красноярск: СО АН СССР, 1959. 247 с.
3. *Доерфель К.* Статистика в аналитической химии. М., Мир, 247 с., 1969.
4. *Заводник И.Б., Пилецкая Т.П.* Биофизика. 42, вып. 5, с. 1106-1112, 1997.
5. *Митрохин Н.М., Мунилов М.В., Команов А.Б.* Биофизика. 34, вып.5, с. 819-825, 1989.
6. *Митрохин Н.М., Юртаев В.В., Голиков Ю.В.* Тез. докл. I Всесоюз. симп., М. с. 60, 1984.
7. *Смирнов Н.Б., Дунин-Барковский И.В.* Курс теории вероятностей и математической статистики для технических приложений. М.-Л.: Наука, 256 с., 1969.
8. *Стусь Л.К.* Биофизика. 39, вып. 2. с. 362 – 364, 1994.
9. *Сукиасян А.Р., Киракосян А.А.* Сборник материалов Международной молодежной конференции Ереван, с. 34-37, 2005.
10. *Трикуленко А.В., Пинишко У.В., Панкевич Г.Л.* Биофизика. 41, вып. 6. с. 1275–1277, 1996.
11. *Франк-Каменецкий Д.А.* Диффузия и теплопередача в химической кинетике. М.: Наука, 481 с., 1967.
12. *Черницкий Е.А., Ямайкина И.В.* Биофизика. 41, вып. 2. с. 417–419, 1996.
13. *Шарипов Ф.К., Киреев Г.В., Колоярова Н.Е., Ходжаев А.В., Бекназаров З.* Клиническая лаборатория диагностики, 5, с.13-52. 2003.
14. *Эмануэль Н.М., Бучаченко А.Л.* Химическая физика старения и стабилизации полимеров. М., Наука, 360 с., 1982.
15. *Ямайкина И.В.* Биофизика. 34, вып. 5. с. 826-832, 1989.
16. *Detraglia M., Cook F., Stasiw D., Cherly L.* Biochim et Biophys. Acta. 345. p. 213–219, 1974.
17. *Niki M., Tamai H., Yamamoto Y., Niki E.* Arch Biochem. Biophys. 358, p. 373-402, 1987.
18. *Try R.* Scand. J. Haematol. 24. p. 157–165, 1980.

Поступила 22.09.2008