
**СИСТЕМНЫЙ АНАЛИЗ ПРИБОРОВ
И ИЗМЕРИТЕЛЬНЫХ МЕТОДИК**

УДК 544.77.03; 544.034

© А. Г. Варехов

**ЭЛЕКТРОДИФФУЗИЯ ЗОНДИРУЮЩИХ ИОНОВ
К ПОВЕРХНОСТИ ЧАСТИЦ БИОКОЛЛОИДОВ**

В статье предлагается решение электродиффузионной задачи, которое может быть использовано в исследованиях суспензий клеток и других частиц (например, липосом) с применением зондирующих (индикаторных) ионов, но также и в прикладных задачах. Например, при изучении доставки в клетки лекарственных препаратов или при изучении воздействия коротких электрических импульсов на клеточные суспензии. Предполагается, что продолжительность процесса электродиффузии определяется не пулом индикаторных ионов, а условиями на поверхности частиц, т. е. поверхностным и электрокинетическим потенциалами. Адсорбция индикаторных ионов кинетически описывается при малых временах (менее одной миллисекунды) как дрейф ионов в электрическом поле у поверхности частицы и диффузия — при относительно больших временах. Обсуждаются оптимальные значения концентрации индикаторных ионов при использовании таких инструментальных методов, как потенциометрический и флуоресцентный анализы.

Кл. сл.: биокolloиды, зондирующие (индикаторные) ионы, электродиффузия, кинетика связывания, оптимальные концентрации

ВВЕДЕНИЕ

Диффузионные процессы, определяющие потоки веществ и энергии в биологических системах, давно стали предметом многочисленных исследований и, в частности, представляют интерес для развития современной мембранной биофизики.

Исследования биологических мембран с использованием зондирующих (индикаторных) ионов, таких, например, как липофильные катионы тетрафенилфосфония (TPP^+) [1] или флуоресцирующих агентов, таких как анилинафталинсульфонат (ANS^-), связывание частицами которого приводит к возрастанию квантового выхода флуоресценции, использующийся для измерения трансмембранного потенциала, и 9-аминоакридин, использующийся для измерения трансмембранного градиента pH, квантовый выход флуоресценции которого при связывании уменьшается почти до нуля (тушение флуоресценции) [2, 3]. Эти исследования способствовали развитию детальных представлений о строении и свойствах мембран клеток и клеточных органелл, а также модельных частиц (например, липосом) различного происхождения [4].

Более подробно потенциометрические и флуоресцентные методы с использованием индикаторных ионов описаны в работах [5, 6].

Электродиффузионный процесс в целом складывается из трех стадий. Первая из этих ста-

дий состоит из управляемых концентрационными и электрическими (потенциальными) градиентами диффузионных и дрейфовых перемещений электролитов и неэлектролитов к поверхности. Адсорбция этих компонентов, т. е. вторая стадия, сопровождается установлением электрохимического равновесия и формированием стационарных или квазистационарных уровней поверхностных потенциалов. Наконец, последняя стадия состоит в появлении трансмембранных потоков, определяющих уровень метаболических изменений. Отметим, что наиболее быстро протекающей стадией является первая, протекающая в наружном по отношению к частице электролите, тогда как третья стадия — наиболее длительной. Точные решения электродиффузионных задач всегда сопряжены со значительными математическими трудностями.

Формирование потенциометрического ответа при зондировании клеточных суспензий является частью фундаментальной задачи исследования механизмов транспорта электролитов и неэлектролитов через клеточные мембраны. Общая формула для потока к поверхности заряженных и незаряженных частиц (ионов и молекул) выражается в известной классической формулировке как произведение подвижности частиц, их концентрации и полной движущей силы, определяемой градиентами химического (концентрации) и электрического (объемной плотности заряда) потенциалов. Одновременный учет обеих компонент движущей

силы приводит к уравнению электродиффузии, т. е. по отношению к сферической клетке — к диффузии в поле центральной электрической силы. Задача анализа сводится к тому, чтобы максимально упростить сложности математического порядка, возникающие, как уже было отмечено, при решении электродиффузионной задачи. Котык и Яначек [7] цитируют Якобса (М.Н. Jacobs) [8], который полагал, что "...в большинстве биологических задач стремиться к математической строгости не только бесполезно, но и ненаучно...". Такой подход, разумеется, не может считаться руководством к действию, но часто является необходимым средством для получения результата.

ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Радиально-симметричная диффузия катионов TRP^+ к сферической клетке при отсутствии электрического поля у ее поверхности определяется уравнением [9, с. 55] (второй закон диффузии Фика)

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{1}{r^2} \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial C}{\partial r} \right) \quad (a \leq r \leq b)$$

с граничными условиями:

а) $C(a, t) = 0$ (условие "прилипания" Смолуховского), т. е. идеальная адсорбция без отражения; a — радиус частицы (клетки);

б) $(\partial C / \partial r)|_{r=b} = 0$ (нулевой поток через поверхность, ограничивающую элементарный объем); $b = r_{\text{cp}} / 2$ (r_{cp} — среднее расстояние между клетками в суспензии); таким образом, поверхность $r = b$ — идеально отражающая.

Начальное условие записывается в виде $C(r, 0) = C_0$ ($a < r \leq b$). D — коэффициент диффузии.

Решение для концентрации ищется [10] методом функции Грина для решения краевых задач и записывается в виде

$$C(r, t) = C_0 \int_a^b 4\pi r'^2 G(r, t, r') dr',$$

где источником диффундирующих частиц при $t = 0$ считается сферический слой толщины dr' и радиуса $a < r' < b$.

Интегрирование приводит [9] к выражению для концентрации

$$C(r, t) = 2C_0 \sum_{n=1}^{\infty} I_n \frac{R_n(r)}{r} \exp(-Dx_n^2 t / b^2),$$

в котором $I_n(x_n), R_n(r, x_n)$ — функции параметров x_n , определяемых как положительные корни трансцендентного уравнения $x_n \operatorname{ctg}[(1-k)x_n] = 1$, где $k = a/b$. В частности, например, при $k = 0.1$ эти корни для $n = 1, 2, 3, 4$ равны соответственно $x_1 = 0.60$; $x_2 = 5.02$; $x_3 = 8.60$; $x_4 = 12.13$, а все последующие значения получаются прибавлением π . Таким образом, ясно, что слагаемые в выражении для концентрации быстро убывают.

Число молекул или ионов, находящихся в момент t в сферическом объеме, ограниченном поверхностями $r = a$ и $r = b$, равно

$$P(t) = \int_a^b 4\pi r^2 C(r, t) dr = P_0 \sum_{n=1}^{\infty} A_n \exp(-t/\tau_n),$$

где

$$P(0) = C_0 \frac{4}{3} \pi (b^3 - a^3); \quad \tau_n = \frac{b^2}{Dx_n^2}; \quad A_n = \frac{6I_n^2}{b^3(1-k^3)}.$$

Доля молекул или ионов, сорбирующихся на поверхности частицы за время t от начала процесса, определяется равенством [9]

$$f(t) = \frac{P(0) - P(t)}{P(0)} = 1 - \frac{P(t)}{P(0)}.$$

Функция $f(t)$ представляет собой плотность вероятности адсорбции индивидуальной индикаторной молекулы или иона (например, TRP^+) за время t от начала процесса, и, следовательно, выполняется условие нормировки

$$\int_0^{\infty} f(t) dt = 1.$$

Среднее время пребывания молекулы в области $a < r < b$ (элементарном объеме суспензии) дается выражением

$$\tau = \frac{\int_0^{\infty} t \frac{df}{dt} dt}{\int_0^{\infty} \frac{df}{dt} dt} = \frac{\int_0^{\infty} t \frac{df}{dt} dt}{f(t)|_0^{\infty}} = \int_0^{\infty} t \frac{df}{dt} dt.$$

Для радиально-симметричной задачи это время равно

$$\tau \cong \frac{b^2}{D} \cdot \frac{1}{x_1^2} \cong \frac{b^2}{D} \cdot \frac{1}{3} \cdot \frac{b}{a}.$$

Отметим, что время τ возрастает с уменьшением концентрации частиц в суспензии.

Недостаток полученного решения состоит

в том, что концентрация $C(r, t)$ с течением времени неограниченно убывает, тогда как практически диффузионный процесс заканчивается за счет исчерпания мест связывания на поверхности $r = a$. Другими словами, процесс электродиффузии лимитируется не пулом диффундирующих молекул или ионов, а условиями на поверхности сорбирующей частицы.

Общее уравнение кинетики электродиффузии в поле центральной силы записывается в виде

$$\int_V \frac{\partial C}{\partial t} dV + \int_S \bar{J} \cdot \bar{n} \cdot dS + \int_V \rho dV = 0,$$

где $\int_V \frac{\partial C}{\partial t} dV$ — скорость изменения концентрации

в объеме V ; $\int_S \bar{J} \cdot \bar{n} \cdot dS$ — поток (массовый и электрический) из объема V через поверхность S , ограничивающую этот объем; \bar{n} — единичная нормаль к поверхности; $\int_V \rho dV$ — скорость уменьшения

концентрации диффундирующих ионов за счет реакций с их участием в диффузионном объеме V (ρ — кинетическая константа закона действующих масс). Отметим, что поглощение индикаторных катионов на граничной поверхности частицы и, следовательно, уменьшение их концентрации неэквивалентно протеканию химической реакции. С другой стороны, уменьшение концентрации при адсорбции должно быть учтено как условие сохранения числа ионов. Это условие будет использовано ниже. Таким образом, положим последний интеграл в кинетическом уравнении равным нулю и перейдем во втором интеграле от потока через поверхность S к потоку из объема V , ограниченного этой поверхностью (теорема Остроградского—Гаусса). В результате запишем равенство

$$\int_V \left(\frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \bar{J} \right) dV = 0.$$

Выражение для электродиффузионного потока \bar{J} как суммы диффузионной и дрейфовой составляющих, известное как уравнение Нернста—Планка для потока, записывается в виде

$$\bar{J} = -RT\mu \nabla C - q\mu \nabla \varphi,$$

где μ — механическая подвижность частиц; R — универсальная газовая постоянная; T — абсолютная температура; $q\mu$ — электрическая подвижность (q — заряд частицы); φ — электрический потенциал; кроме того, $D = RT\mu$ — коэффициент

диффузии; знаки "—" означают движение против градиентов концентрации и потенциала.

Отметим, что координатные зависимости химического (концентрации) и электрического потенциалов недоступны прямым измерениям. Известны лишь конечные разности (скачки) таких потенциалов на границах раздела, например, во внутреннем компартменте клетки по отношению к значениям в инкубационной среде снаружи. Исторически эти координатные зависимости предполагались линейными (приближение Гендерсона (1908 г.) для концентрации и приближение Гольдмана (1943 г.) для электрического потенциала [7]). Линейное приближение будет использовано и в настоящей статье.

Общее электродиффузионное уравнение второго порядка, таким образом, выражается в виде

$$\begin{aligned} \frac{\partial C}{\partial t} + \nabla \bar{J} &= \\ &= \frac{\partial C}{\partial t} + RT\mu \cdot \Delta C + q\mu \cdot \nabla C \cdot \nabla \varphi + q\mu C \cdot \Delta \varphi = 0. \end{aligned}$$

Аналитическое решение этого уравнения в общем виде сопряжено со значительными трудностями. Рассмотрим поэтому некоторые предпосылки для упрощения решения общего уравнения. Для этого рассмотрим элементарный объем, заключенный между двумя концентрическими сферами S и S' радиусов $r > a$ и $r + dr$. Центр такого объема, по понятным соображениям, совпадает с геометрическим центром сферической частицы. Обозначим диффузионные потоки через поверхности этих сфер соответственно J_S и $J_{S'}$. Результирующий поток, направленный к поверхности частицы (клетки), определяется разностью $dJ = J_S - J_{S'}$, а в относительных единицах — соотношениями $dJ/J \cong 2rdr/r^2$ и далее $dJ = (2dr/r)J(r, t)$. Скорость уменьшения концентрации ионов в элементарном сферическом объеме dV за счет диффузии к поверхности $r = a$ выражается соотношением

$$\begin{aligned} \left. \frac{\partial C}{\partial t} \right|_{\text{dif}} &= \frac{dJ \cdot s \cdot dt}{dV \cdot dt} = \frac{J(r, t) \cdot 4\pi r^2 \cdot 2dr \cdot dt}{4\pi r^2 dr \cdot r \cdot dt} = \\ &= \frac{2}{r} J_{\text{dif}}(r, t). \end{aligned}$$

Поскольку эти рассуждения не зависят от физической природы потока, аналогичное соотношение можно записать и для электрической компоненты (дрейфа ионов) потока

$$\left. \frac{\partial C}{\partial t} \right|_{\text{el}} = \frac{2}{r} J_{\text{el}}(r, t).$$

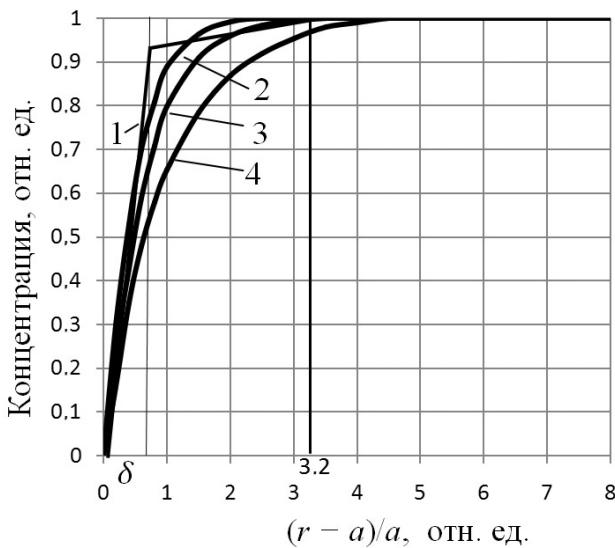


Рис. 1. Характер изменения концентрации при удалении от поглощающей границы. Кривые 2, 3, 4 соответствуют времени $t = 0.2, 0.5, 2$ мс от начала диффузионного процесса ($t = 0$); линейаризация 1, эквивалентная расчетной кривой 2, образована двумя линейно зависящими от времени отрезками; параметр $\delta = (r_i - a)/a \cong 0.6$ определяет толщину обедненного сферического слоя по окончании быстрой фазы процесса; значения $r_i = 4.2a$ и $(r_i - a)/a = 3.2$ получены из условия сохранения числа частиц

Рассмотренная схема, строго говоря, относится к области, достаточно далеко отстоящей от поглощающей поверхности частицы, где обе производные $\partial C/\partial r$ и $\partial \varphi/\partial r$ достаточно малы для того, чтобы можно было пренебречь слагаемым в общем выражении $q\mu \cdot \nabla C \cdot \nabla \varphi$, содержащим произведение этих производных. Целесообразно далее иметь представление об особенностях концентрационной зависимости в ближайшем окружении поглощающей частицы.

РАСЧЕТ НА ОСНОВЕ ТОЧНОГО РЕШЕНИЯ

На рис. 1 представлены результаты расчетов концентрации на основе точного решения, записанного выше. Расчет концентрации $C(r,t)$ был проделан для трех моментов времени (кривые 2, 3, 4), отсчитанных от начала ($t = 0$) диффузионного процесса, т. е. $t = 0.2, 0.5, 2$ мс. При этом было достаточно учесть шесть первых слагаемых в выражении для числа частиц $P(t)$ с постоянными времени $\tau_1 = 174, \tau_2 = 2.5, \tau_3 = 0.845, \tau_4 = 0.425,$

$\tau_5 = 0.257, \tau_6 = 0.173$ мс, причем для самого короткого промежутка времени (0.2 мс) вклады всех слагаемых были соизмеримы. Линейаризация 1 на рис. 1 соответствует нелинейной расчетной кривой 2. Таким образом, линейаризация сводится к замене нелинейной кривой суммой двух линейных отрезков, построенных для интервала $0 < r < r_i$, соответствующего начальной быстрой фазе процесса и обеднению ближней периферической области частицы, и интервала $r_i < r < r_1$, соответствующего установлению равновесия в этой области. Нелинейности в областях $a < r < r_i$ и $r_i < r < r_1$ увеличивают число "избыточных" молекул (по отношению к уровню исходной концентрации C_∞) в области $r_i < r < r_1$ и уменьшают число "вакансий" (также по отношению к уровню C_∞) в области $a < r < r_i$. Для выполнения условия сохранения числа частиц необходимо отодвинуть границу $r = r_i$ вправо. Это увеличивает, как видно на рисунке, ошибку линейаризации. Перемещение же границы $r = r_i$ влево уменьшает ошибку линейаризации, но приводит к несохранению числа молекул. Целесообразно стремиться минимизировать ошибку, о чем следует помнить при анализе окончательных выражений.

В целом представленный на рис. 1 билинейный характер изменения концентрации представляется достаточно обоснованным. В самом деле, в начале диффузионного процесса зондирующие молекулы из тонкого слоя $a < r < r_i$ быстро диффундируют к поверхности; если концентрация молекул достаточно велика, а число мест связывания зондирующих ионов на поверхности мало, изменение концентрации ΔC также невелико. Быстрая фаза диффузионного процесса заканчивается опустошением (обеднением) тонкой области $a < r < r_i$; в дальнейшем, в течение медленной фазы, в объеме суспензии устанавливается равновесная концентрация, протекают процессы установления термодинамического равновесия на поверхности частицы, релаксации двойного электрического слоя и т. д. Хотя в области $a < r < b$ зависимость $C(r,t)$ существенно нелинейна, она может считаться почти линейной в области $a < r < r_i$. Если зависимость $C(r,t)$ линейна или почти линейна, то $\partial^2 C/\partial r^2 \cong 0$ и, следовательно, приближенно выполняется равенство $\nabla^2 C \cong (2/r)\nabla C$.

Точно так же выполняется аналогичное приближенное равенство для потенциала, т. е. $\nabla^2 \varphi \cong (2/r)\nabla \varphi$. Понижение порядка дифференци-

ального уравнения позволяет записать электродиффузионное уравнение в виде

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{2D}{r} \nabla C + \frac{2\mu C}{r} \nabla \varphi,$$

а граничное и начальное условия сформулировать, как и раньше, в виде $C(a, t) = 0$ при $t = 0$, т. е. поверхность $r = a$ является идеально поглощающей; $(\partial C / \partial r)|_{r=b} = 0$ при $t = 0$, т. е. поверхность $r = b$ является идеально отражающей. Это второе условие означает, что поверхности $r = b$ являются границами зерен или элементарных областей, между которыми обмен ионами отсутствует. Обозначим еще равновесные концентрации: $C(r, 0) = C_0$ при $a < r \leq b$ – начальная равновесная концентрация и $C(r, \infty) = C_\infty$ при $a < r \leq b$ – конечная равновесная концентрация.

Решение электродиффузионного уравнения запишем в виде линейной зависимости

$$C(r, t) = \Lambda(t)(r - a),$$

где $\Lambda(t)$ — коэффициент пропорциональности, зависящий от времени. При всех рассматриваемых значениях t выполняется соотношение $\Lambda(t)(r - a) = \text{const} \cong C$; кроме того, при ограниченном числе мест связывания ионов выполняются приближенные равенства $C \cong C_0 \cong C_\infty$.

Запишем выражение для потенциальной функции, используя приближение Дебая—Хюккеля, в виде, основанном на разделении переменных

$$\varphi(r, t) = \zeta(t) \exp[-\chi(r - r_c)],$$

где электрокинетический потенциал $\zeta(t)$ зависит только от времени, а дебаевская длина экранирования $l_D = 1/\chi = (\epsilon \epsilon_0 k_B T / 2ne^2)^{1/2}$ определяется только концентрацией индифферентного электролита n .

Разделение переменных, т. е. запись потенциальной функции в ближайшем окружении частицы в форме $\varphi(r, t) = \zeta(t) \exp[-\chi(r - r_c)]$, на самом деле основано на предположении о том, что структура двойного электрического слоя и положение плоскости $r = r_c$ в течение всего диффузионного процесса определяются концентрацией индифферентного электролита, но не концентрацией индикаторных ионов, которая значительно меньше.

Поскольку установление равновесия в медленной фазе процесса связано с перетеканием ионов в обедненную область $a < r < r_1$, то, очевидно,

имеет место приближенное соотношение (условие сохранения числа частиц):

$$\int_{r_1}^b \Delta C(r) 4\pi r^2 dr \cong \int_a^{r_1} [C_\infty - C(r)] 4\pi r^2 dr,$$

или

$$\begin{aligned} \int_{r_1}^b \Delta C \frac{r - r_1}{b - r_1} 4\pi r^2 dr &\cong \\ &\cong C_\infty \frac{4}{3} \pi (r_1^3 - a^3) - \int_a^{r_1} C_\infty \frac{r - a}{r_1 - a} 4\pi r^2 dr. \end{aligned}$$

Если считать, что на поверхности $r = b$ концентрация не меняется существенно в течение всего диффузионного процесса, то можно положить $\Delta C = C_0 - C_\infty$. Интегрирование приводит к уравнению для безразмерного радиуса $r_{\text{imp}} = r_1/a$ в функции объемной доли $x = \Delta C/C$ сорбированных ионов в форме

$$r_{\text{imp}}^3 (1 + x) + r_{\text{imp}}^2 \left(1 + \frac{x}{k}\right) + r_{\text{imp}} \left(1 + \frac{x}{k^2}\right) = 3 \left(1 + \frac{x}{k^3}\right),$$

где $k = a/b$. В частности, при $x = 0$ получаем $r_{\text{imp}}^3 + r_{\text{imp}}^2 + r_{\text{imp}} = 3$, т. е. $r_{\text{imp}} = 1$ и $r_1 = a$.

Произведем теперь оценочный расчет доли x , основываясь на экспериментальных данных. Используем для этого результаты потенциометрических измерений, полученные в работе [5]. Добавление в инкубационную среду (физиологический раствор) интактных клеток *B. subtilis* приводило к связыванию клетками индикаторных катионов TRP^+ . Изменение потенциала измерительного TRP^+ -селективного электрода после добавления клеток составляло $\Delta \varphi_3 = 1 \text{ мВ}$. Это изменение определялось относительным уменьшением концентрации катионов $x = \Delta C/C$ и могло быть рассчитано в соответствии с равенством $\Delta \varphi_3 = (2.3RT/F) \lg(1 + x)$ (уравнение Нернста—Планка), откуда следует значение $x = 0.04$. Подставляя это значение в выражение, записанное выше, для r_{imp} при $k = 0.1$ получаем значение приведенного радиуса $r_{\text{imp}} = 4.2$ ($r_1 = 4.2a$), отмеченное на рис. 1.

Для оценки времени диффузионного процесса используем известное соотношение (формула Эйнштейна):

$$\overline{r^2} = 2Dt,$$

в котором D — коэффициент диффузии частиц. Относительно значения D для водного раствора

тетрафенилфосфония надежных данных нет, поэтому используем полуэмпирическое выражение вида $D = k_1 k_2$ [11], где k_1 — коэффициент, не зависящий от свойств растворителя, $k_1 = 4 \cdot 10^{-5} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1/2}$ (использованы данные коэффициента k_1 для тетрахлорметана), и k_2 — коэффициент, не зависящий от свойств растворенного вещества, для воды $k_2 = 4.151 \cdot 10^{-5} \text{ м} \cdot \text{с}^{-1/2}$. Таким образом, получаем $D \cong 1.6 \cdot 10^{-9} \text{ м}^2 \cdot \text{с}^{-1}$. Теперь можно оценить среднее время пребывания молекулы в сферическом слое радиуса $a < r < b$, используя приведенное выше выражение $\tau = (1/3)(b^2/D)(b/a)$.

Такое время оказывается равным примерно 200 мс. Это означает, что если концентрация мест связывания зондирующих молекул не ограничена, то суммарное их количество спустя время τ будет находиться в связанном состоянии. Если же принять долю связанного заряда равной $x = 0.04$, то при подстановке в формулу Эйнштейна $r_1 = 4.2a$ и $a = 1 \text{ мкм}$ получим диффузионное время $t = 2.1 \text{ мс}$.

Оценим также влияние диффундирующих к поверхности катионов TRP^+ на поверхностный потенциал. Для этого зададимся относительным изменением концентрации, как и раньше, равным $x = \Delta C/C = 0.04$. Тогда для значения концентрации катионов $C = 10^{-5} \text{ М} \cdot \text{л}^{-1}$ получаем изменение концентрации, равное $\Delta C = 10^{-5} \cdot 0.04 = 4 \cdot 10^{-7} \text{ М} \cdot \text{л}^{-1} = 4 \cdot 10^{-10} \text{ М} \cdot \text{мл}^{-1}$. При концентрации клеток $N = 10^9 \text{ мл}^{-1}$ число индикаторных катионов TRP^+ , сорбирующихся на одной клетке, равно $\frac{\Delta C}{N} N_A = \frac{4 \cdot 10^{-10}}{10^9} \cdot 6.023 \cdot 10^{23} \cong 2.4 \cdot 10^5$. Отметим, что при концентрации 10^9 мл^{-1} среднее расстояние между частицами составляет примерно 10 мкм, а параметр $k = a/b$ для микронных частиц равен 0.1. Кроме того, для микронной частицы средняя площадь, занятая одним катионом TRP^+ на поверхности, составит примерно (7×7) квадратных нанометров. Соответственно суммарный заряд на частицу и поверхностная плотность заряда равны

$$q = e \Delta C N_a / N = 1.6 \cdot 10^{-19} \cdot 2.4 \cdot 10^5 = 3.83 \cdot 10^{-14} \text{ Кл};$$

$$\sigma = q / 4\pi a^2 = 3.83 \cdot 10^{-14} / 4\pi 10^{-12} = 3.2 \cdot 10^{-3} \text{ Кл} \cdot \text{м}^{-2}.$$

Такой заряд в приближении Дебая—Хюккеля соответствует поверхностному потенциалу

$$\Delta\varphi_a = \frac{q}{4\pi\epsilon_0\epsilon a} \cdot \frac{1}{1 + \chi a} = \frac{3.83 \cdot 10^{-14} \cdot 56.6 \cdot 10^{-10} \cdot 10^3}{4\pi \cdot 8.85 \cdot 10^{-12} \cdot 78.3 \cdot 10^{-12}} = 24.9 \text{ мВ}$$

$$(a = 10^{-6} \text{ м}; l_D = 1/\chi = 56.6 \cdot 10^{-10} \text{ м}; \epsilon = 78.3).$$

При этом предполагается, что поляризуемость граничной области определяется водой, т. е. $\epsilon = 78.3$. Поскольку в большинстве случаев поверхностный потенциал не превосходит 100 мВ и, кроме того, поверхностное значение ϵ может быть несколько меньше, а значение $\Delta\varphi_a$ соответственно больше, заданные значения $x = 0.04$ и концентрация зондирующих ионов 10 мкМ оказываются вполне приемлемыми.

Таким образом, в общем случае значения $\Delta\varphi_a$ и φ_a соизмеримы, и, следовательно, поверхностный и электрокинетический потенциалы в исходном электродиффузионном уравнении должны быть функциями времени.

ПРИБЛИЖЕННОЕ РЕШЕНИЕ

Вернемся к исходному уравнению электродиффузии

$$\frac{\partial C}{\partial t} = \frac{2D}{r} \nabla C + \frac{2\mu C}{r} \nabla \varphi.$$

Подставляя решение $C(r, t) = \Lambda(t)(r - a)$ и выражая по модулю градиенты ∇C и $\nabla \varphi$ в виде

$$\nabla C = \frac{\partial C}{\partial r}; \nabla \varphi = \frac{\partial \varphi}{\partial r}$$

и, кроме того, вводя обозначения $\zeta(t) = \varphi_2(t)$ и $\exp[-\chi(r - r_c)] = \varphi_1(r)$, получим соотношение

$$(r - a)\Lambda'(t) = \frac{2D}{r} \Lambda(t) + \frac{2\mu\Lambda(t)(r - a)}{r} \varphi_1'(r) \varphi_2(t).$$

Деля в этом равенстве обе части на $\Lambda(t)$ и интегрируя по t , получаем

$$(r - a) \ln \frac{\Lambda(t)}{\Lambda(0+0)} = \frac{2D}{r} t + \frac{2\mu(r - a)}{r} \varphi_1'(r) \int_0^t \varphi_2(t) dt.$$

В этом последнем выражении предполагается, что к моменту времени $t = 0 + 0$ выполняется равенство $r_1(t = 0 + 0) = r_c$, т. е. спустя малое время от начала процесса опустошается сферический слой толщиной, определяемой расстоянием от поверх-

ности частицы (клетки) до поверхности сферы радиуса, равного радиусу гидродинамического скольжения. Для не слишком малых частиц толщина этого слоя оценивается значением $r_c - a \cong 0.7l_D$. Для микронных частиц при $l_D \cong 60 \text{ \AA}$ (приведено выше) толщина слоя, таким образом, составляет около (40–50) \AA .

Введя далее обозначение

$$\int_0^t \varphi_2(t) dt = \psi_2(t)$$

и интегрируя по переменной r , получаем общее выражение в виде:

$$\begin{aligned} \ln \frac{\Lambda(t)}{\Lambda(0+0)} \int_{r_c}^{r_1} (r-a) dr = \\ = 2Dt \int_{r_c}^{r_1} \frac{dr}{r} + 2\mu\varphi_2(t) \left[\int_{r_c}^{r_1} \varphi_1'(r) dr - a \int_{r_c}^{r_1} \frac{\varphi_1'(r)}{r} dr \right]. \end{aligned}$$

Для интегрирования второго слагаемого в квадратных скобках правой части равенства произведем сначала дифференцирование $\varphi_1(r)$ в подынтегральном выражении

$$-a \int_{r_c}^{r_1} \frac{\varphi_1'(r)}{r} dr = -\chi a \int_{r_c}^{r_1} \frac{e^{-\chi(r-r_c)}}{r} dr = -\chi a e^{\chi r_c} \int_{r_c}^{r_1} \frac{e^{-\chi r}}{r} dr.$$

Используем затем способ интегрирования [12]

$$\int_y^\infty \frac{e^{-mt}}{a+t} dt = -e^{ma} \text{Ei}[-m(a+y)]$$

и правило для вычисления интеграла Эйлера $\text{Ei}(-y)$ при больших значениях аргумента:

$$\text{Ei}(-y) = -F_1 \frac{e^{-y}}{y},$$

где

$$F_1 = 1 - \frac{1!}{y} + \frac{2!}{y^2} - \frac{3!}{y^3} + \dots$$

Здесь $y = \chi r_c \cong \chi \cdot a$ — аргумент функции Эйлера. Для совокупности значений $a = 10^{-6} \text{ м}$; $\chi = 1/l_D = 1.765 \cdot 10^8 \text{ м}^{-1}$ получаем $y = 177$ и $F_1 \cong 1$. Учитывая дополнительно, что подынтегральная функция $\exp(-\chi r)/r$ быстро убывает, записываем далее

$$\begin{aligned} -\chi a e^{\chi r_c} \int_{r_c}^{r_1} \frac{e^{-\chi r}}{r} dr \cong -\chi a e^{\chi r_c} \int_{r_c}^\infty \frac{e^{-\chi r}}{r} dr = \\ = \chi a e^{\chi r_c} \frac{e^{-\chi r_c}}{\chi r_c} \cong 1. \end{aligned}$$

Таким образом, получаем равенство

$$\begin{aligned} \frac{1}{2}(r_1 - r_c)^2 \ln \frac{\Lambda(t)}{\Lambda(0+0)} = \\ = \left(2D \ln \frac{r_1}{r_c} \right) t + 2\mu\psi_2(t) \exp[-\chi(r_1 - r_c)]. \end{aligned}$$

Используем после этого условие

$$\Lambda(t) \cdot (r_1 - a) = \Lambda(0+0) \cdot (r_c - a) = C, \text{ или}$$

$$\frac{\Lambda(t)}{\Lambda(0+0)} = \frac{r_c - a}{r_1 - a},$$

на основании которого запишем

$$\begin{aligned} (r_1 - r_c)^2 \ln \frac{r_c - a}{r_1 - a} = \\ = 4Dt \ln \frac{r_1}{r_c} + 4\mu\psi_2(t) \exp[-\chi(r_1 - r_c)]. \end{aligned}$$

Деление обеих частей этого последнего выражения на $(r_1 - r_c)^2$ определяет равенство

$$\begin{aligned} \ln \frac{r_c - a}{r_1 - a} = \frac{1}{(r_1 - r_c)^2} \times \\ \times \left\{ 4Dt \ln(r_1/r_c) + 4\mu\psi_2(t) \exp[-\chi(r_1 - r_c)] \right\}, \end{aligned}$$

которое позволяет записать безразмерную кинетическую функцию в виде суммы диффузионного и дрейфового слагаемых:

$$\Phi(t) = \frac{4D \ln(r_1/r_c)}{(r_1 - r_c)^2} t + \frac{4\mu \exp[-\chi(r_1 - r_c)]}{(r_1 - r_c)^2} \psi_2(t).$$

К моменту окончания быстрой фазы электро-диффузионного процесса должно выполняться, как уже отмечалось выше, условие сохранения числа ионов, т. е.

$$\Delta C \cdot \frac{4}{3} \pi (b^3 - a^3) = \int_a^{r_1} C \left(1 - \frac{r-a}{r_1-a} \right) 4\pi r^2 dr,$$

которое после интегрирования приводит к уравнению

$$r_{\text{инп}}^3 + r_{\text{инп}}^2 + r_{\text{инп}} = 4x \frac{1-k^3}{k^3} + 3,$$

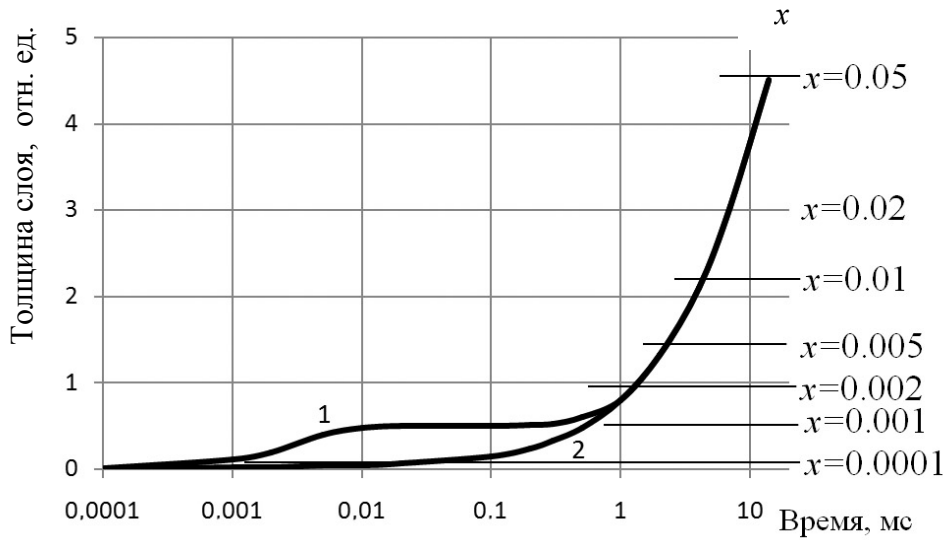


Рис. 2. Объемная доля сорбированных ионов (x) и толщина в относительных единицах обедненного сферического слоя $((r_1 - a)/a)$ в функции времени для суммарной (дрейфовой и диффузионной) (1) и диффузионной (2) составляющих

где по-прежнему $r_{1np} = r_1/a$, $x = \Delta C/C$, $k = a/b$ при $x = 0$, как и выше, получаем $r_{1np} = 1$ и $r_1 = a$.

Сравним теперь диффузионные и дрейфовые слагаемые в дифференциальном электродиффузионном уравнении. Для этого вычислим квадраты перемещений катионов TRP^+ вблизи поверхности частицы (клетки), т. е. при условии $r = r_c$ и, следовательно, $\exp[-\chi(r - r_c)] = 1$,

$$\overline{r^2} = 2Dt \text{ и } r^2 = \mu^2 t^2 (\nabla\varphi)^2 = \frac{\mu^2}{l_D^2} \zeta^2 t^2.$$

Учитывая, что $D = (k_B T/e)\mu$, и принимая значения $D = 1.6 \cdot 10^{-5} \text{ см}^2 \cdot \text{с}^{-1}$, $l_D = 0.566 \cdot 10^{-6} \text{ см}$, $k_B T/e = 25.7 \text{ мВ}$ и $\zeta = 60 \text{ мВ}$, получаем отношение

$$\frac{\overline{r^2}}{r^2} = \frac{D\zeta^2 t}{2l_D^2 (k_B T/e)^2} = 1.36 \cdot 10^8 t, \text{ или}$$

$$\frac{r}{\sqrt{\overline{r^2}}} \cong 1.16 \cdot 10^4 \sqrt{t}.$$

Таким образом, при известных параметрах (электрокинетический потенциал частиц или клеток, свойства электролита, температура, а также заданные свойства индикаторных ионов, т. е. прежде всего коэффициент диффузии и подвижность) временной масштаб определяется множителем \sqrt{t} .

Рис. 2 показывает полученное расчетным путем соотношение дрейфовой и диффузионной составляющих электродиффузионного переноса для нескольких последовательных фаз процесса, определяемых объемной долей x сорбированных ионов. При $x > 0.0001$, т. е. в самом начале процесса, дрейфовые перемещения ионов превышают диффузионные уже при временах $t > 10^{-6} \text{ с}$. При этом толщина обедненного слоя $(r_1 - a)/a$ в относительных единицах составляет менее 0.1, а разность $r_1 - a$ для микронной частицы — менее 0.1 мкм (100 нанометров). Это соответствует быстрой, начальной фазе процесса (см. рис. 1), когда велика напряженность поля, определяемая градиентом ионов $\nabla\varphi$. Однако при $x > 0.001$ и $(r_1 - a)/a \cong \cong 0.4$, т. е. $r = r_c + (5 \div 6)l_D$, электрическое поле ослабевает настолько, что при временах $t = 0.1 \text{ мс}$ обе составляющие соизмеримы, а при $t > 1 \text{ мс}$ полностью преобладает диффузионный поток. Таким образом, для достаточно больших частиц, т. е. при $\chi a \gg 1$, процесс диффузии начинается как электрический дрейф катионов TRP^+ в сильном поле около поверхности частицы, но в дальнейшем определяется почти исключительно диффузией. Целесообразно поэтому считать, что в полученной кинетической функции

$$\Phi(t) = \frac{4D \ln(r_1/r_c)}{(r_1 - r_c)^2} t + \frac{4\mu \exp[-\chi(r_1 - r_c)]}{(r_1 - r_c)^2} \psi_2(t)$$

первое слагаемое описывает весь процесс электродиффузии, а второе слагаемое описывает процесс при малых временах. Таким образом, можно составить две системы уравнений, первая из которых может быть записана в форме

$$\begin{cases} r_{1np}^3 + r_{1np}^2 + r_{1np} = 4x \frac{1-k^3}{k^3} + 3, \\ \ln \frac{r_c - a}{r_1 - a} = \frac{4D \ln(r_1/r_c)}{(r_1 - r_c)^2} t = \Phi_1(t), \end{cases}$$

а вторая система — в форме, где первое уравнение получается путем дифференцирования первого уравнения первой системы по переменной x , т. е.

$$\begin{cases} \delta r_{1np} (3r_{1np}^2 + 2r_{1np} + 1) = \frac{4(1-k^3)}{k^3} \delta x, \\ \ln \frac{r_c - a}{r_1 - a} = \frac{4\mu \exp[-\chi(r_1 - r_c)]}{(r_1 - r_c)^2} \psi_2(t) = \Phi_2(t). \end{cases}$$

В первом уравнении второй системы величины δx и δr_{1np} обозначают малые приращения объемной доли сорбированных индикаторных ионов и толщины (в относительных единицах) обедненного сферического слоя. Отметим, что приращение объемной доли определяет характер реального сигнала, характерного для используемой экспериментальной техники, в частности [5], при потенциометрических измерениях с использованием ионселективного мембранного электрода.

ВЫВОДЫ

Динамические свойства коллоидной системы при добавлении индикаторных ионов определяются всей совокупностью процессов, включая пассивные (конвекцию и перемешивание), но также и электродиффузионный процесс адсорбции ионов, определяющийся свойствами поверхности частиц. Временная структура переходного процесса и соответственно полученные кинетические уравнения отражают все процессы, происходящие на поверхности частиц.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Flewelling R.F., Hubbell W.L.* Hydrophobic ion interactions with membranes. Thermodynamic analysis of tetraphenylphosphonium binding to vesicles // *Biophys. J.* 1986. Vol. 49, no. 2. P. 531–540.
2. *Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е.* Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
3. *Lemke E.A., Schultz C.* Principles for designing fluorescent sensors and reporters // *Nature Chemical Biology.* 2011. Vol. 7, no. 8. P. 480–483.
4. *Остроумова О.С., Ефимова С.С., Малев В.В., Шагина Л.В.* Ионные каналы в модельных липидных мембранах. СПб.: Изд. Ин-та цитологии РАН, 2012. 164 с.
5. *Варехов А.Г.* Потенциометрические измерения трансмембранного потенциала клеток с использованием проникающих ионов // *Научное приборостроение.* 2015. Т. 25, № 1. С. 27–35. URL: <http://213.170.69.26/mag/2015/abst1.php#abst3>.
6. *Варехов А.Г.* Флуоресцентное зондирование суспензий биологических частиц (обзор) // *Научное приборостроение.* 2016. Т. 26, № 2. С. 29–36. URL: <http://213.170.69.26/mag/2016/abst2.php#abst4>.
7. *Котык А., Яначек К.* Мембранный транспорт. Междисциплинарный подход. М.: Изд. Мир, 1980. 341 с.
8. *Jacobs M.H.* Diffusion Processes. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1967. 160 p.
9. *Марри Дж.* Нелинейные дифференциальные уравнения в биологии: лекции о моделях. М.: Мир, 1983. 397 с.
10. *Карслоу Г., Егер Дж.* Теплопроводность твердых тел. М.: Изд. Наука, 1964. 367 с.
11. Краткий справочник физико-химических величин / Составители: Барон Н.М., Квят Э.И. и др. Л.: Изд. Химия, Лен. отделение, 1967. 182 с.
12. *Двайт Г.Б.* Таблицы интегралов и другие математические формулы. М.: Изд. Наука, Гл. Ред. физ.-мат. лит., 1978. 224 с.

Санкт-Петербургский Государственный университет аэрокосмического приборостроения

Контакты: *Варехов Алексей Григорьевич*,
varekhov@mail.ru

Материал поступил в редакцию 4.10.2017

THE ELECTRODIFFUSION OF PROBING IONS TO BIOCOLLOIDS SURFACE

A. G. Varekhov

St. Petersburg State University of Aerospace Instrumentation, Russia

The solution of the electrodiffusion problem that can be used in study of suspensions of cells and other particles (for example, liposomes), using probing ions, but also can be used in application-oriented tasks is proposed in this article. For example, in case of a medicines delivery study in cells or in case of a study of impact of short electrical pulses on cellular suspensions. It is supposed that duration of process of electrodiffusion is determined not by a pool of probing ions, but conditions on surfaces of particles, that are surface and electrokinetic potentials. In case of small times (less than one millisecond) the adsorption of probing ions is kinetically described as drift of ions in an electric field at a surface of a particle and in case of rather big times it is described as diffusion. The best values of probing ions concentration, when using such instrumental methods as the potentiometric and fluorescent analysis, are proved.

Keywords: biocolloids, probing ions, electrodiffusion, binding kinetics, optimum concentration

REFERENCES

1. Flewelling R.F., Hubbell W.L. Hydrophobic ion interactions with membranes. Thermodynamic analysis of tetraphenylphosphonium binding to vesicles. *Biophys. J.*, 1986, vol. 49, no. 2, pp. 531–540. Doi: 10.1016/S0006-3495(86)83663-3.
2. Vladimirov Yu.A., Dobrecov G.E. *Fluorescentnye zondy v issledovanii biologicheskikh membrane* [Fluorescent probes in a research of biological membranes]. Moscow, Nauka Publ., 1980. 320 p. (In Russ.).
3. Lemke E.A., Schultz C. Principles for designing fluorescent sensors and reporters. *Nature Chemical Biology*, 2011, vol. 7, no. 8, pp. 480–483. Doi: 10.1038/nchembio.620.
4. Ostroumova O.S., Efimova S.S., Malev V.V., Shagina L.V. *Ionnye kanaly v model'nykh lipidnykh membranah* [Ion channels in model lipide membranes]. Saint-Petersburg, Institute of Cytology RAS, 2012. 164 p. (In Russ.).
5. Varekhov A.G. [Potentiometric measurements of transmembrane potential of cells with use of the penetrating ions]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2015, vol. 25, no. 1, pp. 27–35. Doi: 10.18358/np-25-1-i2735. (In Russ.).
6. Varekhov A.G. [Fluorescent probing of biological particles suspensions]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2016, vol. 26, no. 2, pp. 29–36. Doi: 10.18358/np-26-2-i2936. (In Russ.).
7. Kotyk A., Yanachek K. *Membrannyj transport. Mezhdisciplinarnyj podhod* [Membranous transport. Cross-disciplinary approach]. Moscow, Mir Publ., 1980. 341 p. (In Russ.).
8. Jacobs M.H. *Diffusion Processes*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 1967. 160 p. Doi: 10.1007/978-3-642-86414-8.
9. Marry G. *Nelinejnye differencial'nye uravneniya v biologii: lekcii o modelyah* [Non-linear differential equations in biology: lectures about models]. Moscow, Mir Publ., 1983. 397 p. (In Russ.).
10. Carslaw H.S., Jaeger J.C. *Conduction of Heat in Solids*. Clarendon Press, 1986. 510 p. (Russ. ed.: Karslou G., Eger Dzh. *Teploprovodnost' tverdykh tel*. Moscow, Nauka Publ., 1964. 367 p.).
11. Baron N.M., Kvyat E.I., eds. *Kratkij spravochnik fiziko-himicheskikh velichin* [Quick reference guide of physical and chemical values]. Leningrad, Chemistry Publ., 1967. 182 p. (In Russ.).
12. Dwight H.B. *Tables of Integrals and Other Mathematical Data*. N.Y., 1966. 336 p. (Russ. ed.: Dvajt G.B. *Tablicy integralov i drugie matematicheskie formuly*. Moscow, Nauka Publ., 1978. 224 p.).

Contacts: *Varekhov Aleksey Grigor'evich*,
varekhov@mail.ru

Article received in edition: 4.10.2017