

УДК [577.161.2:544.252.24]:543.42

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

ON A POSSIBILITY TO MONITOR THE VITAMIN D FORMATION PROCESSES USING SELECTIVE REFLECTION PROPERTIES OF CHOLESTERIC LIQUID CRYSTALS

O.V. Korzovska, I.P. Terenetskaya*, L.N. Lisetski

Institute for Single Crystals, NAS of Ukraine, 60 Lenin Ave., 61001 Kharkov, Ukraine,
e-mail: lisetski@isc.kharkov.com

*Institute of Physics, NAS of Ukraine, 46 Nauki Ave., 03039 Kiev, Ukraine

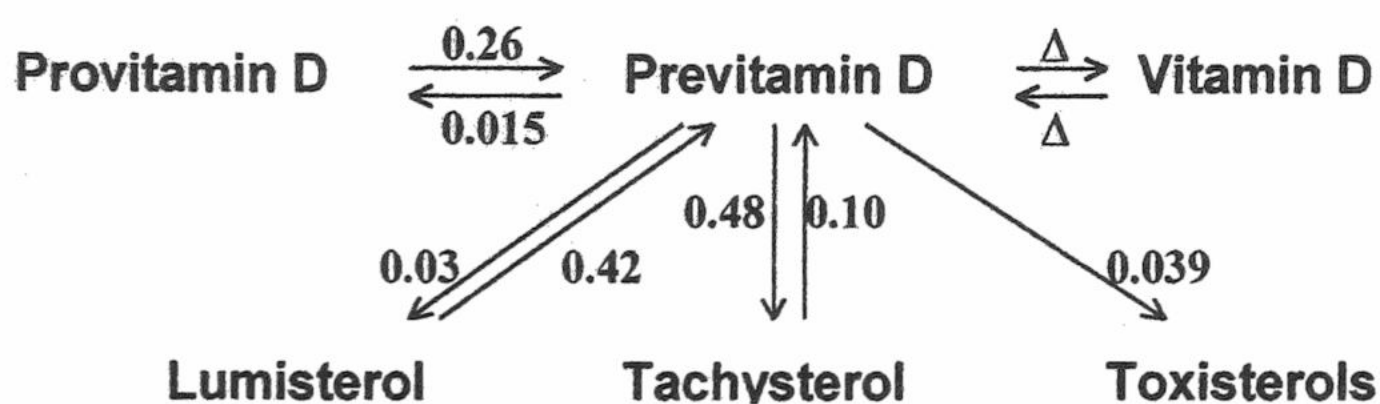
Received April 20, 2000

For sterols of vitamin D group, temperature-dependent selective reflection spectra have been measured in the cholesteric matrix. It has been found experimentally that chiral molecules of vitamin D isomers significantly affect optical properties of cholesteric matrices. It has been shown that shifts of selective reflection peaks in the systems studied can be used for monitoring of vitamin D formation reactions induced by UV irradiation. Alongside with purely steroidal matrices based on cholesterol esters, an optimized composition with induced helical structure has been proposed, ensuring the absence of intrinsic absorption in the 250-300 nm range. The use of this matrix allows to simultaneously study both selective reflection and electronic spectra. The photoisomerization processes were shown to be affected by supramolecular ordering of the solvent. Possible use of the proposed approach for creation of biomimetic UV detectors is discussed.

KEY WORDS: liquid crystals, vitamin D, photoisomerization, UV irradiation, selective reflection spectra, electronic spectra.

Many characteristics of liquid crystalline substances are known to be substantially modified by introduction of non-mesogenic dopants. Among the most sensitive properties in this respect is the helical pitch of cholesteric mesophase, which can be readily determined from selective reflection spectra [1]. The dopant-induced changes in the helical pitch values have been shown to correlate with both structure features of the dopant molecules and the nature of their interaction with the cholesteric matrix [2, 3]. In our previous works, such approach has been successfully applied to substances of biological origin - phospholipids, fatty acids, amino acids, oligo- and polypeptides, steroids, etc. [4-6]. In this paper, we report our studies on several substances of vitamin D group used as non-mesogenic dopants in cholesteric matrix.

Previtamin D* formation under UV irradiation represents the first stage of the biologically important process of vitamin D synthesis. UV irradiation of provitamin D (Pro) in solution (ethanol, hexane) within its absorption band (240 - 315 nm) yields previtamin D (Pre) by hexadiene ring-opening. Once formed, previtamin D converts into vitamin D (D) by the thermoinduced intramolecular hydrogen shift. However, the photochemical stage is considerably complicated by the side photoconversions of previtamin D that has the absorption band in the same spectral region as is provitamin D, and under UV irradiation undergoes a series of the phototransformations (Scheme) [7]. Reversible *cis-trans* isomerization into tachysterol (T) exhibits the highest quantum yield, and reversible ring-closures into initial provitamin D or its diastereomer lumisterol (L) are less probable. The irreversible channel includes a number of solvent-dependent photoconversions of previtamin D into so-called toxisterols [8].



An important point is that contrary to starting provitamin D with rigid steroid skeleton, previtamin D is conformationally flexible. As a result, its formation should significantly change (decrease) the twisting power of the dopant and thus affect the optical properties of a LC matrix [9]. Our idea was to check the possibility to use changes in selective reflection spectra for monitoring of provitamin D photoisomerization under UV-irradiation.

* In spite of the fact that the term vitamin D is employed in general sense, two principal chemical species of vitamin D are available. Vitamin D₂, or ergocalciferol (C₂₈H₄₄O) is synthesized from ergosterol (provitamin D₂) similarly to vitamin D₃, or cholecalciferol (C₂₇H₄₄O) which is produced from 7-dehydrocholesterol (7-DHC, provitamin D₃).

MATERIALS AND METHODS

Two types of cholesteric matrices were used: Matrix 1 based on cholesterol 3 β -derivatives (cholesterol oleate/cholesterol chloride 80:20 wt. %), and Matrix 4 which additionally contained an eutectic mixture of cyclohexanecarboxylic acids (CHCA). The dopants studied (ergosterol, cholesteryl benzoate, vitamin D₂, provitamin D₃ benzoate) were incorporated into Matrix 1 in weight ratio 1:10 and in Matrix 4 in weight ratio 1:20. Their influence on cholesteric helical pitch was registered by the method of selective reflection (SR) of light by the planar texture of cholesteric mesophase.

Planar texture of cholesteric mesophase is obtained as thin (3-50 μ m) layer with the axis of the cholesteric helix being normal to substrates. Such structure possesses a number of specific optical properties, in particular, selective reflection of the incident light with the wavelength of maximum reflection for the normal incidence $\lambda_{\max} = np$ (where n - refractive index, p - helical pitch) [1].

SR spectra for the cholesteric mixtures were recorded using a Hitachi-330 spectrophotometer in a temperature-controlled cell with 10 μ m layer thickness. The samples were irradiated by the total spectrum of a ДПИИ-250 Hg-lamp during 130 min; after that, the samples were kept for 18 to 40 hours in darkness. The distance from the source to the sample was 75 cm, the temperature of samples was 31-34 $^{\circ}$ C.

RESULTS AND DISCUSSION

The changes in $\lambda_{\max}$ vs. temperature dependencies for Matrix 1 caused by steroids of vitamin D group are presented in Fig. 1a. The high-temperature breaks on the plots correspond to the temperatures of isotropic phase transition of the systems. In spite of chemical similarity of the substances incorporated into the cholesteric matrix, they affect the liquid crystalline parameters in different ways: the temperature of the isotropic transition can be lowered or raised, and the helical pitch can be increased or decreased. This can be associated with different conformational flexibility of the dopants that substantially affects twisting power. As was mentioned above, ergosterol (provitamin D₂) has rigid steroid skeleton contrary to vitamin D₂ molecule where intramolecular rotation around C-C single bond has low energy barrier at room temperature. Additional flexibility is inherent to cholesteryl benzoate and 7-DHC-benzoate due to intramolecular rotations around single C-C bonds that change orientation of benzoate fragment in relation to steroid skeleton [10]. It should be noted that the slope of the $\lambda_{\max}(T)$ plots remains almost unchanged, indicating that chemical binding with the matrix molecules did not occur.

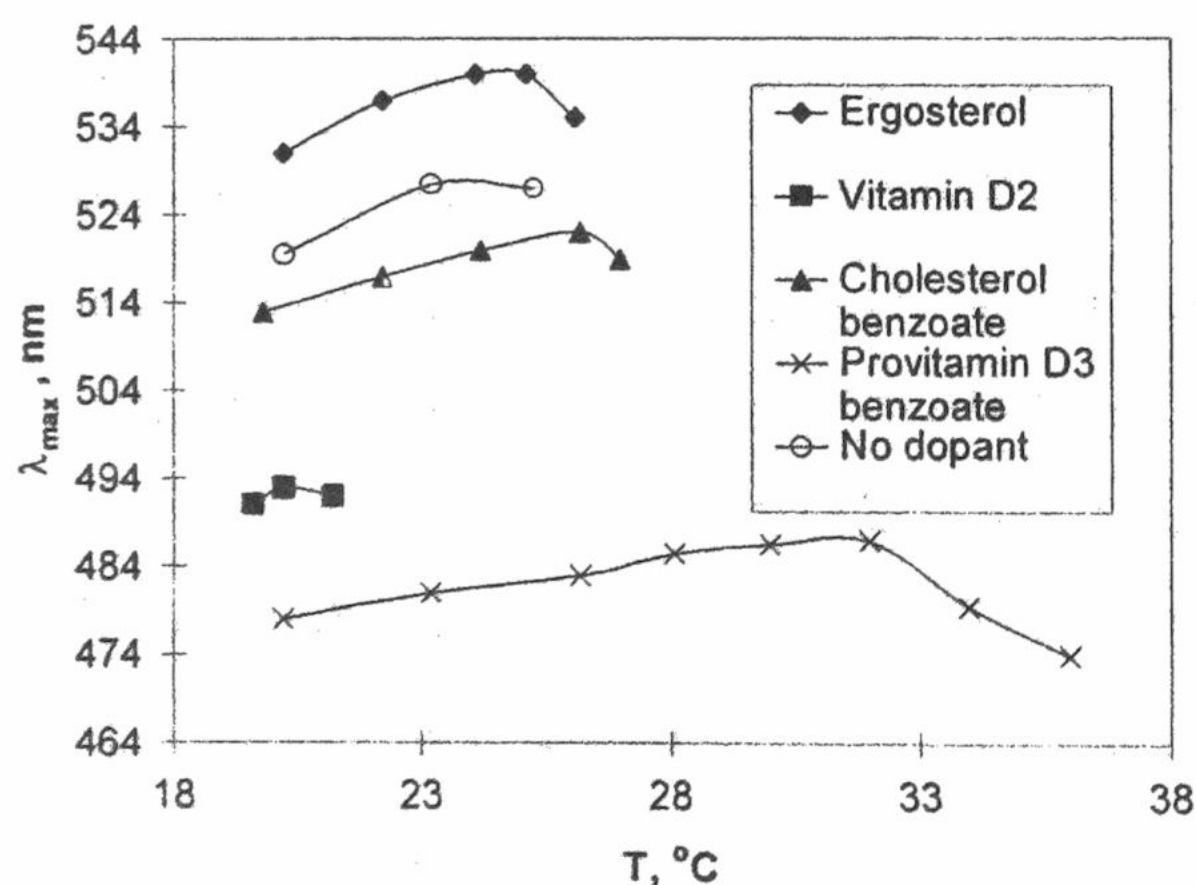


Fig. 1. Cholesteric pitch of Matrix 1 and its temperature changes upon introduction of vitamin D derivatives.

The effects observed are strong enough to draw clear distinction between the dopants used. To obtain more reliable results it seemed appropriate to compare the observed helical pitch changes with the corresponding changes in UV absorption spectra of the cholesteric matrix (Fig. 1b). Most of the mixtures normally exhibit strong absorption bands in UV-region, which may affect the observed spectral changes. So, it would be highly desirable to use a matrix transparent in the UV-region. We have selected a matrix composition (Matrix 4) giving over 50 % transmission down to 250 nm and SR peaks in the red region of the visible spectrum (Fig. 2). Using matrix 4, we get a possibility to simultaneously observe changes both in electronic spectra and in SR peak position. Introduction of provitamin D₃ benzoate shifts the selective reflection peak to the blue region, and the provitamin absorption bands appear (solid line of Fig. 2).

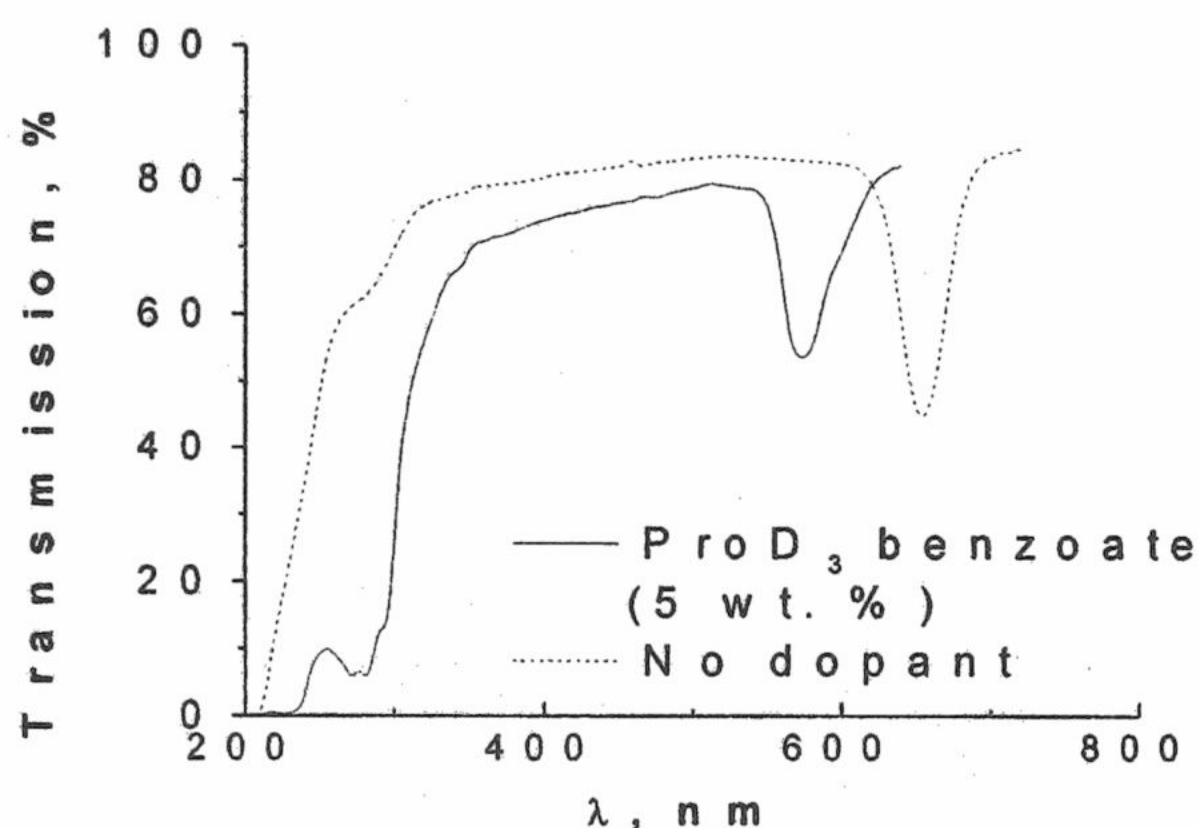


Fig. 2. Electronic and selective reflection spectra of Matrix 4 doped with provitamin D₃ benzoate.

For the next step of our work (studying the effects of UV irradiation), preliminary check up of the Matrix 4 UV sensitivity seemed reasonable. No significant changes have been observed in the transmission spectrum of Matrix 4 both under UV irradiation and during considerable time afterwards. The helical pitch also remains unchanged (Fig. 3).

In the presence of provitamin D₃ benzoate a considerable decrease in $\lambda_{\max}$ is observed under UV irradiation, which is evidently caused by the formation of some ProD₃ photoisomers. This can not be associated with hexadiene ring-opening, that is usually observed in homogeneous solutions because formation of flexible molecule of previtamin D should decrease helical twisting power of the dopant. Most likely the formation of some other ProD₃ photoproducts may be assumed. It is worth reminding (see Fig. 1) that among all the dopants used ProD₃ causes the largest shift in thermal stability of Matrix 1 and causes the largest shift of the helical pitch (effective helical twisting power [11] was estimated by us as 3.55 cm^{-1} , or $\lambda_{\text{eff}} = 280 \text{ nm}$). But even larger decrease in $\lambda_{\max}$, observed in Fig. 3, indicates that some substances are being formed with even larger helical twisting power values than that of ProD₃ benzoate. By the way, this fact may serve as an indirect evidence for the relevance of our approach, because neither of compounds tested in Matrix 1 was a direct product of ProD₃ benzoate photoisomerisation. A non-linear nature of the time dependence is most likely due to formation of more than one photoisomer under the experimental conditions. After stopping UV irradiation, changes in $\lambda_{\max}$ continued, suggesting that some photostimulated secondary dark reactions could occur.

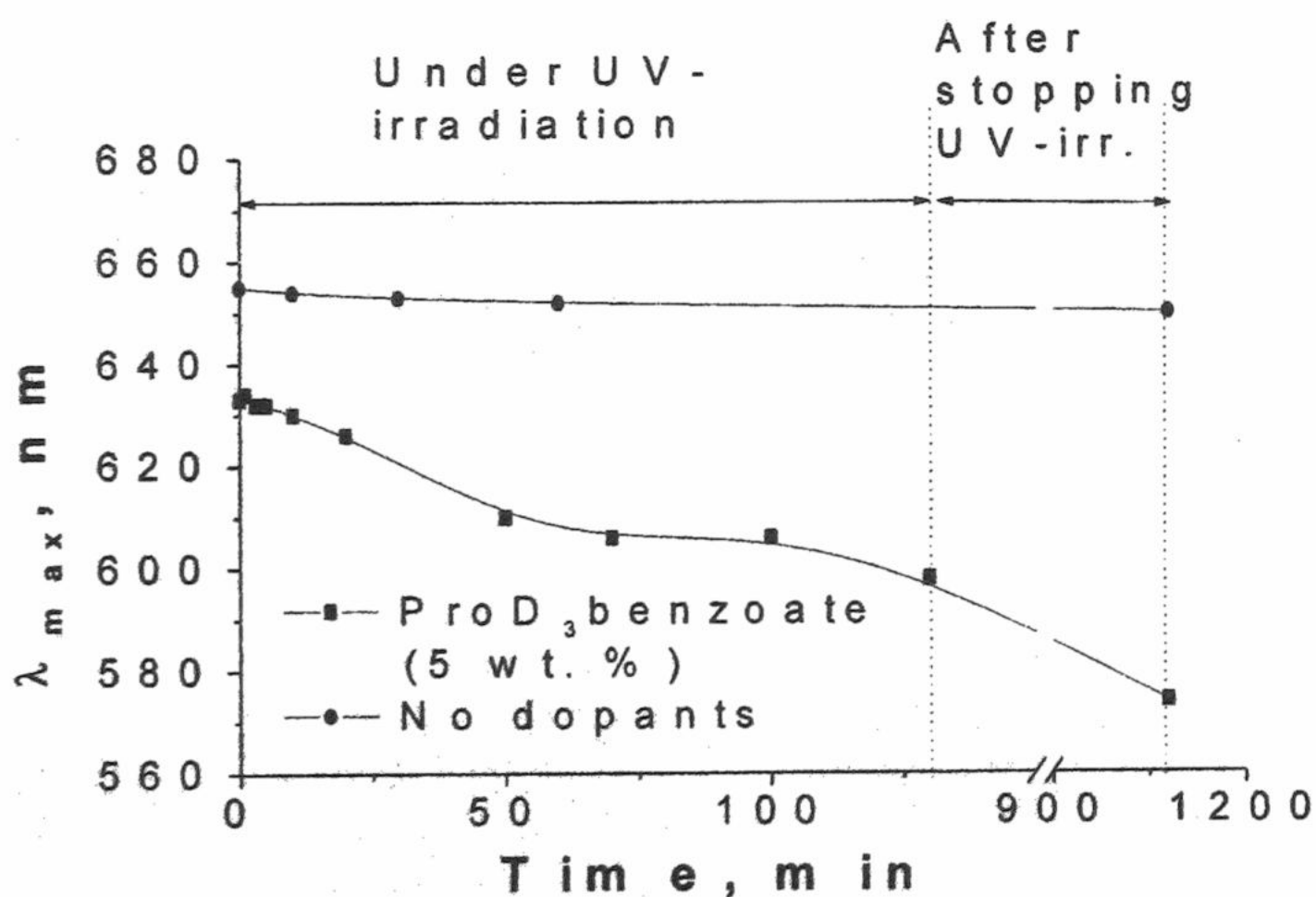


Fig. 3. Cholesteric pitch of Matrix 4 (doped and undoped with ProD₃ benzoate) as function of UV irradiation time.

The next important point was the influence of an ordered media on the photoisomerisation processes. For this purpose, ProD₃ benzoate was UV-irradiated in three different media: hexane, Matrix 4 and CHCA eutectic mixture. The last one is an ordered medium which closely resembles to hexane by its molecular composition and to Matrix 4 by the type of molecular ordering.

The kinetics of absorption intensity changes was compared in UV-region. Two absorption bands were chosen for comparison: 230 nm, which corresponds to absorption of benzoic acid residue, and 280 nm, corresponding to steroid core absorption (Fig. 4). As one can see, the type of medium can affect both extinction values and the nature of their changes under UV irradiation. It should also be noted that the greatest changes in the general appearance of the curves are observed just for 280 nm band, whereas almost no changes are noted for 230 nm band after 30 min exposure. Evidently, all photoisomerisation processes cause structural changes only within steroid core of ProD₃ benzoate.

As the type of ProD₃ benzoate interaction with CHCA matrix was suggested to be similar to its interaction with hexane, the difference observed between isomerisation mechanisms in these two media should be mainly due to the mesophase ordering effects.

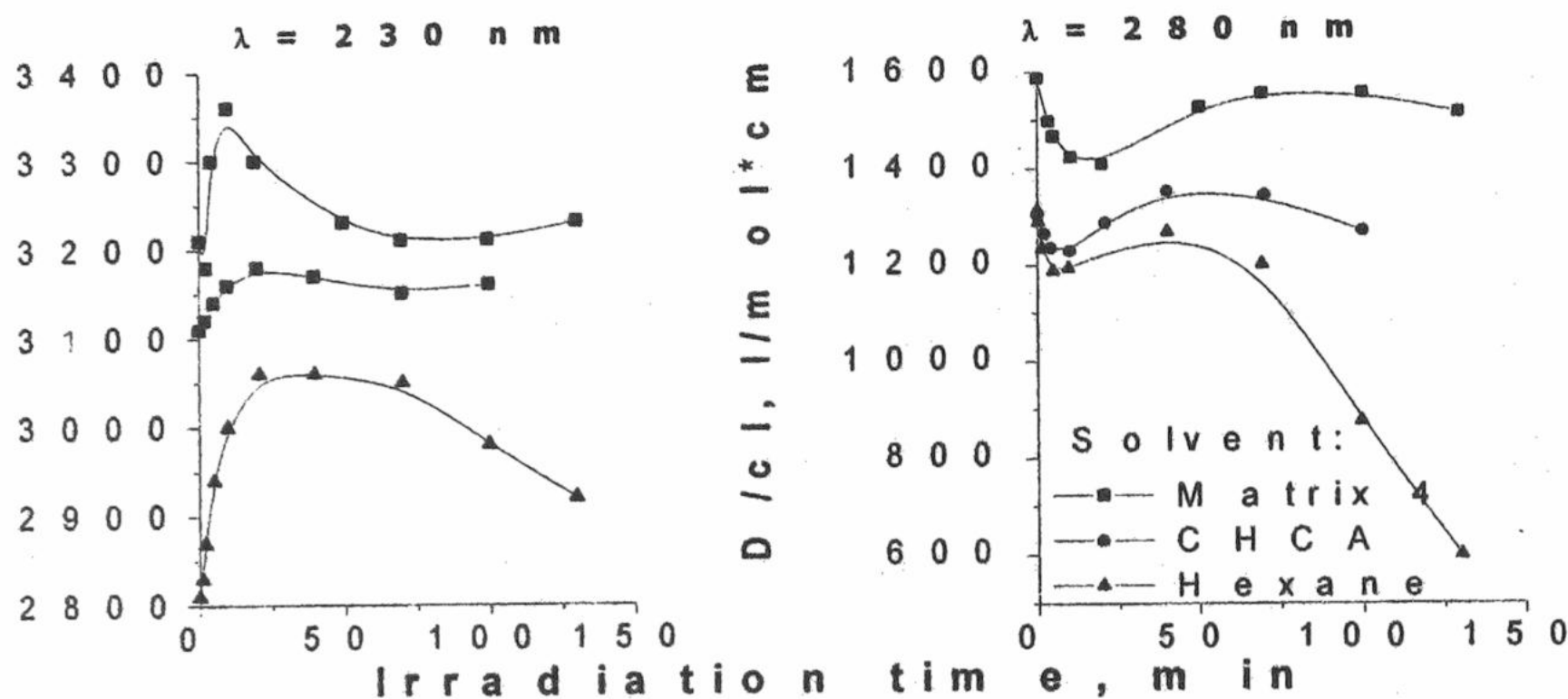


Fig. 4. Dependence of provitamin D₃ benzoate absorbance in different solvents on the UV exposure (c – molar concentration before irradiation; l – cell thickness).

CONCLUSIONS

It has been shown that shifts of selective reflection peaks in the cholesteric matrix can be used for monitoring of vitamin D formation reactions induced by UV irradiation. Changes observed in the selective reflection spectra were substantial enough to be used in studies of UV-induced vitamin D formation reactions. The photoisomerization processes were shown to be affected by supramolecular ordering of the solvent.

Dependence of the selective reflection on the irradiation UV dose has been observed that may be exploited for UV dosimetry. The results obtained indicate a possibility to create a biomimetic UV detector based on monitoring of vitamin D formation in liquid crystalline media, though specific effect of microenvironment on the photoisomerization mechanism of ProD₃-benzoate in liquid crystalline matrix needs further study.

REFERENCES

1. Беляков В.А., Сонин А.С. Оптика холестерических жидких кристаллов. М.: Наука, 1982. 350 с.
2. Willey D.G., Martire D.E. // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1972. V. 18. No. 1. PP. 55-74.
3. Chilaya G.S., Lisetski L.N. // *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 1986. V. 140. No. 2/4. PP. 243-286.
4. Паникарская В.Д., Лисецкий Л.Н., Тищенко В.Г. // *Журн. физ. химии.* 1982. Т. 56. № 11, С. 2861-2862.
5. Корзовская О.В., Лисецкий Л.Н., Паникарская В.Д., Антонян Т.П. // *Журн. физ. химии.* 1998. Т. 72. №10. С. 1896-1898.
6. Корзовская О.В., Лисецкий Л.Н., Паникарская В.Д. // *Известия РАН.* 1998. Т. 62. № 8. С. 1695-1697.
7. Jacobs H.J. and Havinga E. // *Adv. Photochem.* 1979. V. 11. PP. 305-373.
8. Boomsma F., Jacobs H.J.C., Havinga E., van der Gen A. // *J. Royal Netherlands Chem. Soc.* 1977. V. 96. No. 4. PP. 104-112.
9. Dyadyusha A.G., Gvozdevsky I.A., Salkova E.N., Terenetskaya I.P. // *Semiconductor Physics, Quantum & Optoelectronics.* 1999. V.2. No. 4. PP. 91-95.
10. Головина Н.А., Загайнова Л.И., Полищук А.П., Пучковская Г.А., Татаринов С.И. // *Журн. прикладной спектроскопии.* 1988. № 5. С. 833-839.
11. Baessler H. and Labes M.M. // *J. Chem. Phys.* 1970. V. 52. No. 2. PP. 631-637.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 57.043

ФІЗИКО-МАТЕМАТИЧНИЙ АНАЛІЗ ТА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ЩІЛЬНОСТІ РОЗПОДІЛУ ЕРИТРОЦИТІВ ДОНОРСЬКОЇ І ПУПОВИННОЇ КРОВІ ЛЮДИНИ ЗА ІНДЕКСОМ СФЕРИЧНОСТІ

Є.О.Гордієнко*, О.І.Гордієнко*, І.Ф.Коваленко*, Ю.Є.Паніна*, Алексєєв О.О.**

Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, 61015, Харків, вул. Переяславська, 23*

Харківський національний університет ім. В.Н. Каразіна, 61077, Харків, пл. Свободи, 4**

Поступила в редакцію 23 квітня 2000р.

За експериментально визначеними кривими осмотичної крихкості знайдені функція та щільність розподілу еритроцитів донорської і пуповинної крові за індексом сферичності при температурах 37° С і 3° С.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: еритроцити людини, метод малокутового розсіяння світла, індекс сферичності.

Визначення осмотичної крихкості еритроцитів людини і тварин вже давно застосовується в якості діагностичного тесту для встановлення їх функціональної повноцінності. Експериментальне вимірювання цього показника здійснюється таким чином. Невелика кількість еритроцитів змішується з гіпотонічними розчинами хлориду натрію, об'єм якого значно перевищує загальний об'єм клітин. Далі будь-яким чином, наприклад, по вмісту гемоглобіну в надсадковій рідині відносно повної кількості гемоглобіну в тому ж числі еритроцитів, визначається частка клітин, які зазнали гемолізу при спливанні достатньо великого проміжку часу експозиції клітин в цьому розчині. Почергово вміщуючи еритроцити в гіпотонічні розчини хлориду натрію різної концентрації (в діапазоні від 0,15 М до 0,06М) знаходять залежність частки еритроцитів, що зазнали гемолізу після тривалого контакту з гіпотонічним розчином хлориду натрію, від концентрації останнього:

$$h = \frac{N_r}{N} = h(n^{out}) \quad (1).$$

Тут N_r - число еритроцитів, що зазнали гемолізу в гіпотонічному розчині хлориду натрію з концентрацією n^{out} , N - повне число еритроцитів, внесених в цей розчин.

Мета даної роботи полягає в тому, щоб, виходячи із сучасних теоретичних уявлень щодо процесу гіпотонічного гемолізу, здобути з експериментально визначеної залежності (1) інформацію про первісний розподіл так званого індексу сферичності еритроцитів в дослідженій популяції клітин і залежність цього клітинного параметру від температури.

Індексом сферичності еритроциту в первісному стані (до контакту з гіпотонічним розчином хлориду натрію) називається величина

$$P_0 = \frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi} \cdot V_0},$$

де S_0 і V_0 - площа поверхні мембрани еритроциту і його об'єм в цьому стані. Цей геометричний параметр є кількісною мірою відмінності форми мембрани еритроциту від сферичної. Для сферичної клітини $S_0 = 4\pi R_0^2$, $V_0 = \frac{4}{3}\pi R_0^3$ і P_0 дорівнює одиниці. В міру відхилення форми клітини від сферичної параметр P , очевидно, збільшується і наближається до значення

$$P = \frac{S_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi} \cdot V_n},$$

де V_n - об'єм, зайнятий внутрішньоклітинним гемоглобіном. З іншого боку, якщо $P < 1$, то мембрана сфероциту неодмінно зазнає ізотропного розтягу.

Зміна об'єму клітин V з часом t в гіпотонічному розчині не проникаючої в клітини речовини до моменту, коли клітина стає сферою, описується звичайним диференціальним рівнянням

$$\frac{dV}{dt} = S_0 L_p R T (n^{in} - n^{out}) \quad (2),$$

де L_p - коефіцієнт фільтрації клітинної мембрани, n^{in} і n^{out} - концентрація (моль/м³) внутрішньо- і позаклітинного розчинів відповідно, R - універсальна газова постійна, T - абсолютна температура. Переходячи до безвимірних змінних $y = V/V_0$ (відносний об'єм клітини), $\hat{n}^{in} = n^{in}/n^{in}(0)$, $\hat{n}^{out} = n^{out}/n^{in}(0)$ (приведений осмотичний тиск внутрішньо- і позаклітинного розчину), де $n^{in}(0)$ - початкова концентрація внутрішньоклітинного розчину, можна представити (2) у вигляді

$$\frac{dy}{dt} = \frac{1}{\tau_o} (\hat{n}^{in} - \hat{n}^{out}) \quad (3)$$

де $\tau_o = \left[\frac{S_0}{V_0} L_p R T n^{in}(0) \right]^{-1}$ - характерний час, за який вирівнюються сумарні концентрації внутрішньо-

та позаклітинного розчинів. Для еритроцита людини, котрий порівняно з іншими клітинами має аномально високе значення поверхнево-об'ємного відношення S_0/V_0 і коефіцієнту фільтрації

L_p , $\tau \approx 10^{-2}$ с. Тому значення сумарних концентрацій розчинених всередині і поза клітинами речовин практично миттєво стають однаковими.

Оскільки, об'єм позаклітинного розчину значно перевищує об'єм вміщених в нього еритроцитів, $\hat{n}^{out}$ можна вважати незмінним і рівним його початковому значенню $\hat{n}^{out} = \hat{n}^{out}(0)$. За визначенням

$n^{in} = \frac{N^{in}}{V - V_n}$, N^{in} - сумарна кількість молів розчинених всередині клітини речовин. У початковий

момент часу

$$n^{in}(0) = \frac{N^{in}}{V_0 - V_n} \quad (4)$$

$$\hat{n}^{in} = \frac{n^{in}}{n^{in}(0)} = \frac{V_0 - V_n}{V - V_n} = \frac{1 - \alpha}{y - \alpha} \quad (5),$$

де $\alpha = V_n/V_0$ - об'ємна частка осмотично неактивних внутрішньоклітинних речовин.

За даними роботи [1] для еритроцита людини $\alpha = 0,42$. З урахуванням (4), (5)

$$y_\infty = \alpha + \frac{1 - \alpha}{\hat{n}^{out}(0)} \quad (6).$$

Таким чином, практично миттєво відносний об'єм еритроцитів, занурених в гіпотонічний розчин ($\hat{n}^{out}(0) < 1$) непроникаючої речовини збільшується до значення y_∞ . При цьому, очевидно, еритроцити набрякають, і та клітина, котра первісно мала індекс сферичності P_0 , буде мати індекс сферичності

$$P = \frac{\Sigma_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi} \cdot V_\infty} = \frac{\Sigma_0^{3/2}}{6\sqrt{\pi} \cdot V_0 y_\infty} = P_0 \frac{1}{y_\infty} = P_0 \frac{1}{\alpha + (1 - \alpha)/\hat{n}^{out}} \quad (8)$$

де P - поточне значення індексу сферичності еритроцита, P_0 - первісне значення індексу сферичності еритроцита. При цьому значення індексу сферичності у частини еритроцитів набуде значення меншого за 1. Очевидно, це відбудеться з тими сфероцитами, площа поверхні мембрани яких за рахунок ізотропного розтягування перевищить P_0 . Відомо, що будь-яке скільки завгодно мале ізотропне розтягнення мембрани еритроциту при спливанні достатньо великого проміжку часу призводить до його гемолізу. Тому, при контакті з гіпотонічним розчином хлориду натрію прогемолізують всі клітини, індекс сферичності яких набуває значення, меншого за 1, тобто для яких $P_0 < \alpha + (1 - \alpha)/\hat{n}^{out}$.

Експериментально визначаючи, що при осмотичному тиску позаклітинного розчину $\hat{n}^{out}$ прогемолізувала частка клітин h , ми тим самим визначаємо частку еритроцитів, первісне значення

індексу сферичності $S_0^{3/2} / 6\sqrt{\pi} \cdot V_0$ котрих було менше, ніж $y_\infty = \alpha + (1 - \alpha) / \pi^{out}$. Переходячи від залежностей, що представлені на рис. 1 і 2 до залежностей $h = h(y)$, отримуємо первісний розподіл індексу сферичності в популяції еритроцитів досліджуваного донора, тобто залежність частки клітин, індекс сферичності яких перевищує відповідне значення аргументу [2]. Диференціюючи цю функцію по аргументу, знаходимо відповідну щільність розподілу індексу сферичності в досліджуваній популяції еритроцитів.

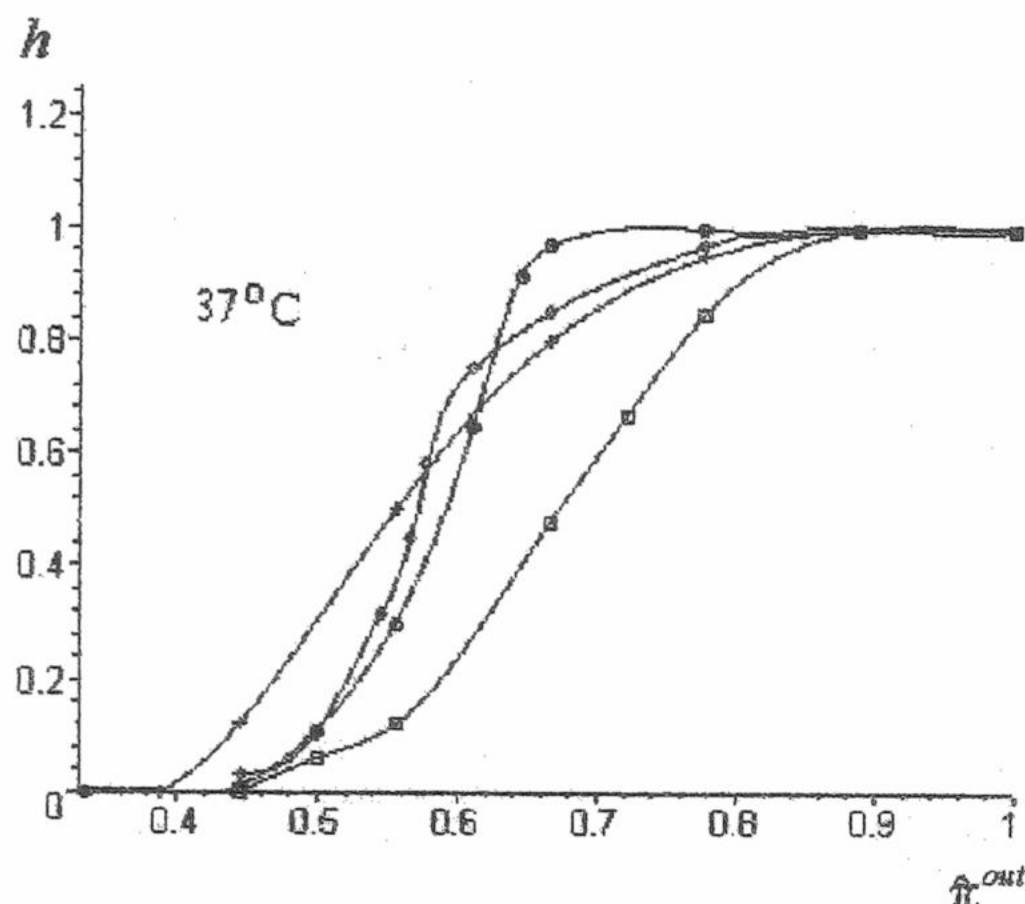


Рис.1.Криві осмотичної крихкості еритроцитів чотирьох донорів при температурі 37 °С

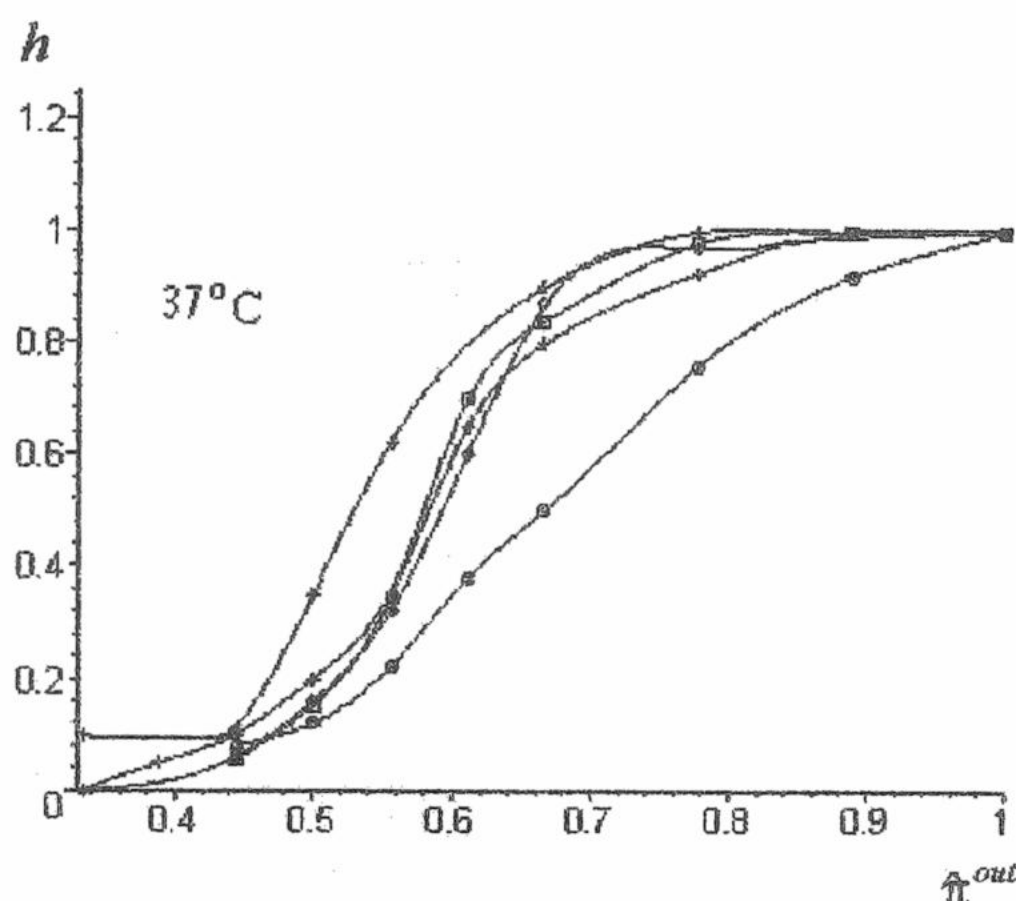


Рис.2.Криві осмотичної крихкості еритроцитів семи зразків плацентарної крові при температурі 37 °С

На рис. 1 і 2 подані експериментально визначені методом малокутового розсіювання світла [3] криві осмотичної крихкості еритроцитів донорської та пуповинної крові людини при температурі 37° С. З урахуванням залежності (7) з них легко визначаються відповідні функції розподілу, а також щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності (рис. 3,4). На рис. 5 (а,б) і 6 наведені також щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності для донорської при двох температурах (37 і 3° С) і для пуповинної крові при трьох температурах (37, 20 і 3° С).

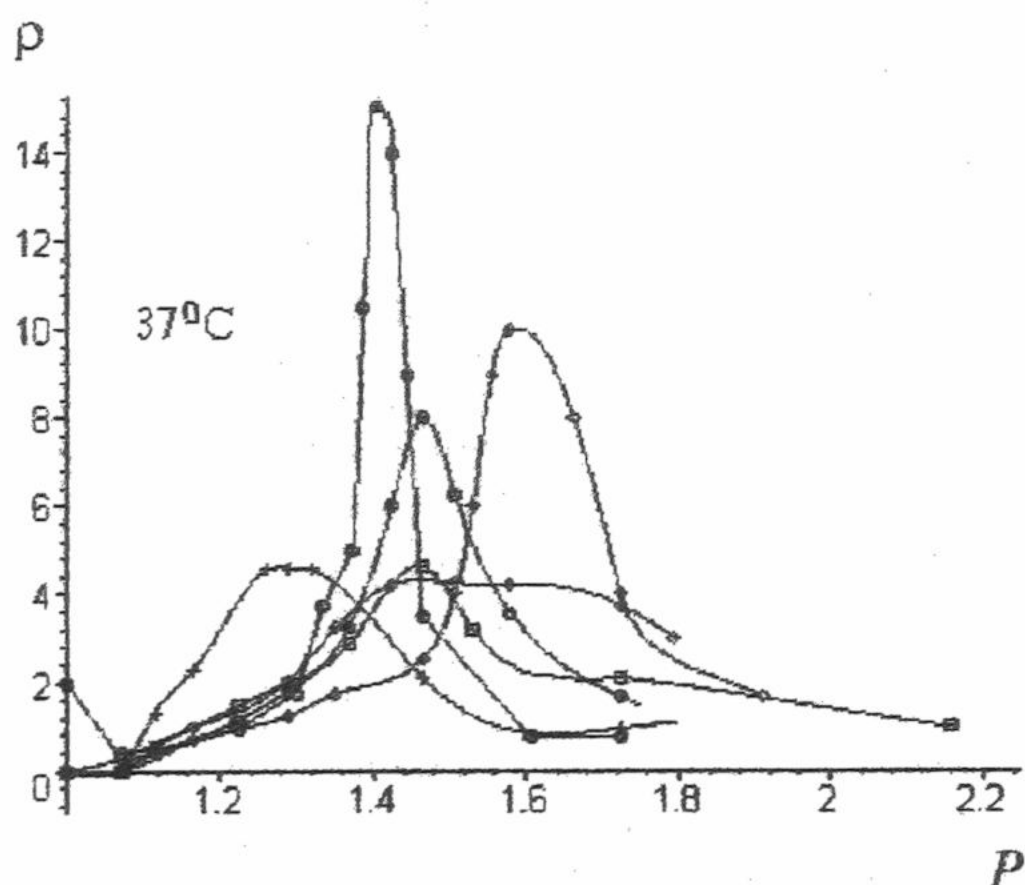


Рис.3.Щільності розподілу еритроцитів шести донорів за індексом сферичності при температурі 37°С.

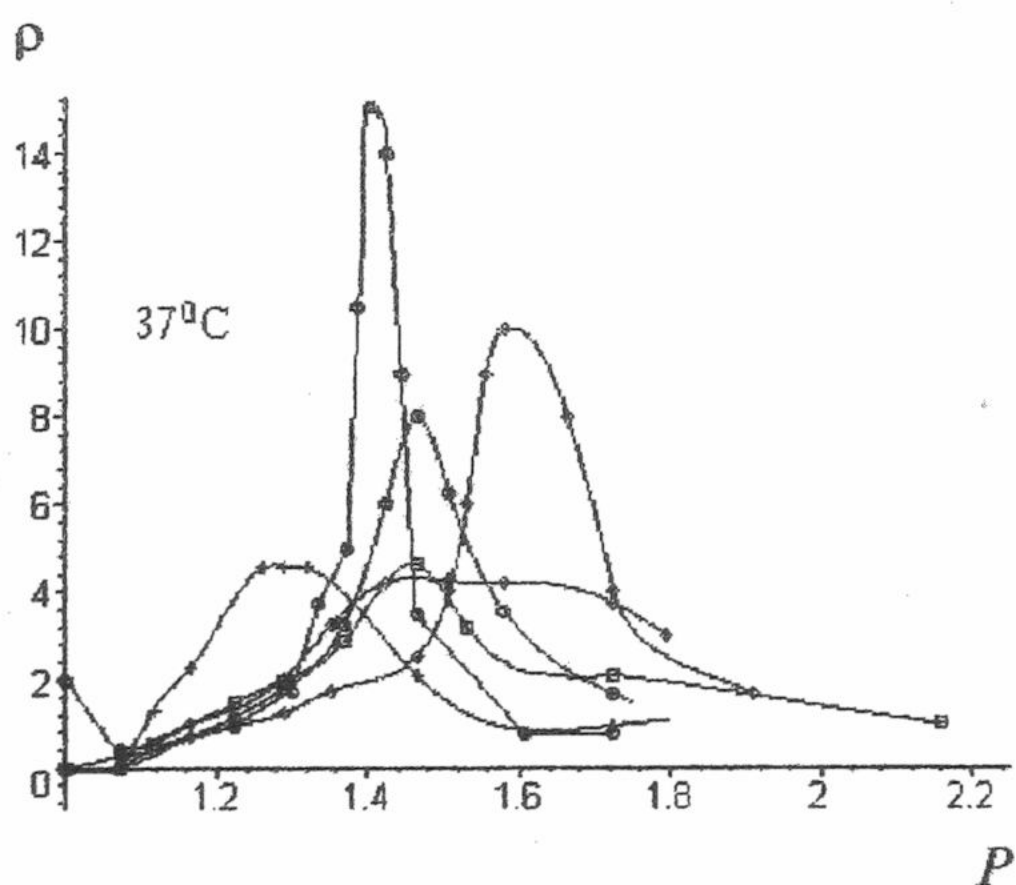


Рис.4.Щільності розподілу еритроцитів восьми зразків пуповинної крові за індексом сферичності при температурі 37 °С

З ортаманих результатів випливає, що розподіл еритроцитів за індексом сферичності для різних донорів і різних зразків пуповинної крові може значно відрізнятися один від одного, що, ймовірно, відбиває як індивідуальні особливості еритропоезу та загальний стан здоров'я донорів крові, так і умови заготівлі та зберігання зразків крові до початку дослідження.

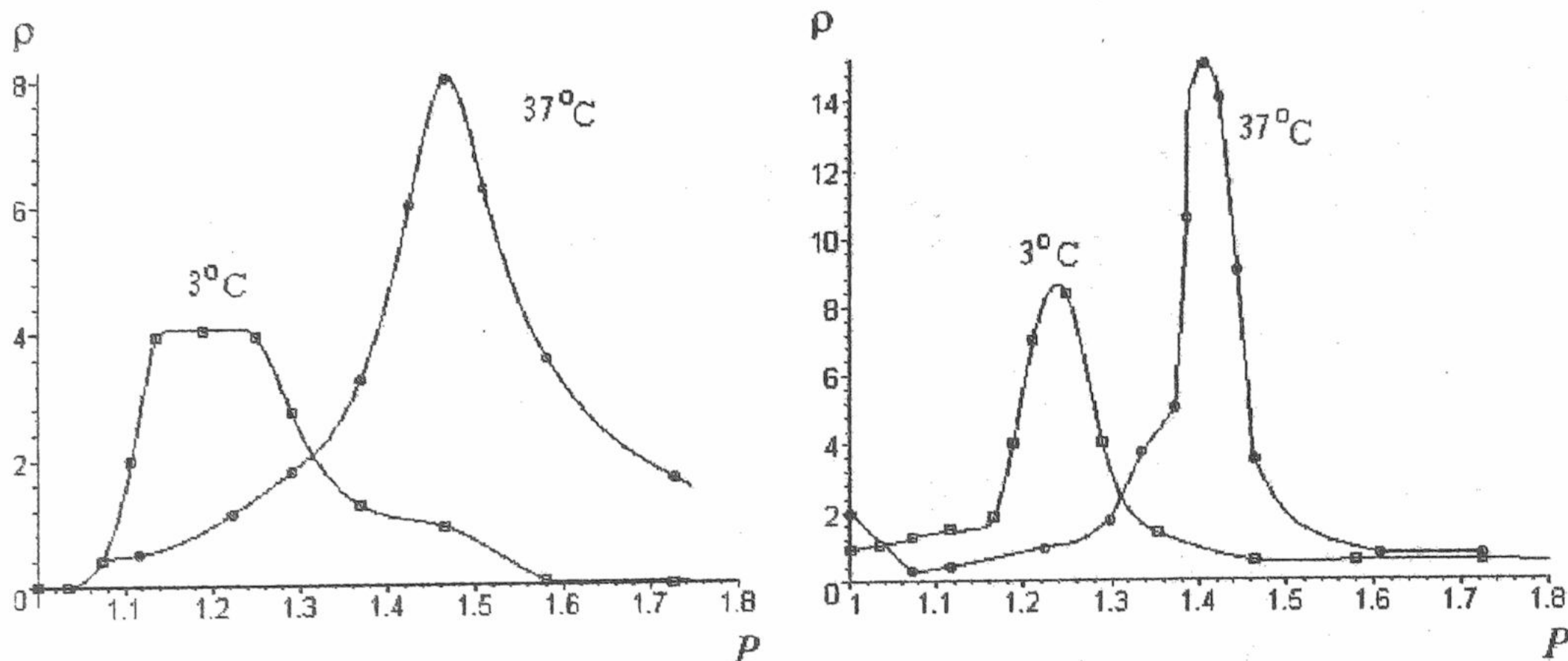


Рис.5.Щільності розподілу еритроцитів двох донорів (а,б) за індексом сферичності при температурах 37 і 3°C.

Щільність цього розподілу, як відомо [4], відбиває динамічну рівновагу між кількістю ретикулоцитів, які викидаються в периферійну кров з кісткового мозку, та кількістю старих еритроцитів, які руйнуються в селезінці. Перші мають значення індексу сферичності біля двох, а другі - біля одиниці, тоді як значення індексу сферичності нормоцитів в середньому дорівнює 1,42 та міститься в інтервалі значень від 1,45 до 1,21 (ці значення розраховані нами за даними, що наведені в [5]. Таким чином зсув щільності розподілу в той, або в інший бік від нормального свідчить або про наявність компенсаційного процесу відновлення кількості еритроцитів в периферійній крові.

Відмінність значення щільності розподілу еритроцитів за індексом сферичності від нуля при $P = 1$ свідчить про те, що в популяції еритроцитів, що досліджується, деякі клітини є сфероцитами, тобто знаходяться в передгемолітичному стані. В руслі крові такі клітини неспроможні циркулювати без пошкодження по кровеносним мікросудинам [6].

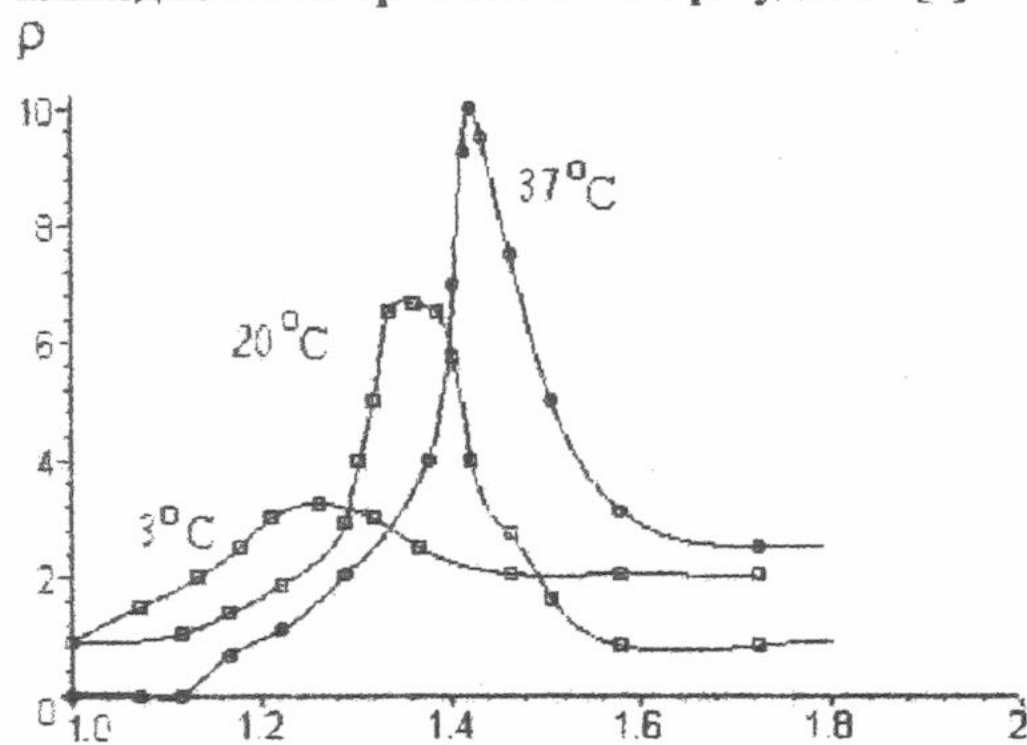


Рис.6.Щільності розподілу зразка пуповинної крові за індексом сферичності при температурах 37, 20 і 3°C

Як видно, зниження температури гіпотонічного розчину хлориду натрію, в якому експонуються клітини, від 37° до 3° С веде до зменшення середнього значення індексу сферичності клітин. Оскільки внутрішньоклітинна рідина практично є незстисливою, можна вважати, що зменшення індексу сферичності відбувається виключно за рахунок зменшення площі поверхні мембран еритроцитів на величину, що приблизно дорівнює $\Delta S/S_0 = 2\Delta P_{\max}/P_{\max}$. З отриманих нами результатів випливає, що значення коефіцієнту теплового розширення площі поверхні мембран еритроцитів в інтервалі температур від 37°C до 3°C для різних зразків крові міститься в діапазоні від 10^{-3} до $4 \cdot 10^{-3}$ на 1°C, що цілком задовільно узгожується з літературними даними [7].

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Canham P.B., Parkinson D.R. // Can. J. Physiol. Pharmacol. - 1970. - V.48. - P.369-376.
2. Прохоров Ю.В., Розанов Ю.А. Теория вероятностей. - М.: Наука, 1973. - 494с.
3. Гордієнко О.І., Коваленко І.Ф., Паніна Ю.І. // Доповіді НАН України. - 1998. - N11. - С.173-176.
4. Кассирский И.А., Алексеев Г.А. Клиническая гематология. - М.: Медицина, 1970. - 800с.
5. Fung E.C., Winston C.O., Tsang W.C.O., Ranilucci P. // Biorheology. - 1981. - V.18. - P.369-385.
6. Гардаш Л.И., Гордієнко Е.А. // Биофиз. вестник. - 1999. - вып. 4(2). - С.53-58.
7. Ивене И., Скейлак Р. Механика и термодинамика биологических мембран. - М.: Мир, 1982. - 304с.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 576.17:612.014:612.4

ДОСЛІДЖЕННЯ Ca^{2+} -ТРАНСПОРТНИХ СИСТЕМ СЕКРЕТОРНИХ КЛІТИН ЕКЗОКРИННИХ ЗАЛОЗ З ВИКОРИСТАННЯМ ХЛОРТЕТРАЦИКЛІНУ

В.В.Манько, Т.В.Король, М.Ю.Клевець, О.Т.Демків

Львівський національний університет імені Івана Франка,

Інститут екології Карпат НАН України

Надійшла до редакції 6 березня 2000 р.

У роботі експериментально обґрунтовано використання мікрофлуориметричного методу визначення вмісту мембрано-зв'язаного Ca^{2+} для дослідження властивостей Ca^{2+} -транспортних систем секреторних клітин слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: секреторні клітини, екзокринні залози, хлортетрациклін, мембрано-зв'язаний Ca^{2+} , потенціалкеровані кальцієві канали, кофеїн(ріанодин)чутливі кальцієві канали, Ca^{2+} -помпа, Na^+ - Ca^{2+} -обмінник

Збільшення квантового виходу флуоресценції комплексу Ca^{2+} з хлортетрацикліном (ХТЦ) при переході з водного в гідрофобне оточення дозволяє визначати його вміст в клітинних мембранах, який залежить від концентрацій Ca^{2+} в середовищах, що контактують з ними. У зв'язку з цим на основі зміни флуоресценції можна судити про функціональну активність трансмембранних Ca^{2+} -транспортних систем. Цей підхід отримав широке використання в експериментах на субклітинному рівні і застосовується для з'ясування механізмів транспортування Ca^{2+} через внутрішньоклітинні мембрани. Так, зокрема, на основі зміни інтенсивності флуоресценції суспензій мітохондрій [1, 2, 3] та везикул ендо(сарко)плазматичного ретикулуму [4, 5] досліджували енергозалежне нагромадження Ca^{2+} у них. Дещо менше ХТЦ використовували для вивчення Ca^{2+} -залежних процесів на цілих тканинах [6], і практично не використовували для досліджень із застосування мікрофлуориметрії на окремих клітинах в складі тканин.

Крім того, відсутні дані про застосування ХТЦ для дослідження Ca^{2+} -транспортних систем секреторних клітин екзокринних залоз. А відомо, що рівень внутрішньоклітинного Ca^{2+} у екзокринних залозах визначає протікання основних стадій секреторного процесу. Тому метою нашої роботи було дослідити зміни вмісту мембрано-зв'язаного Ca^{2+} у секреторних клітинах слинної залози личинки *Chironomus plumosus* L. під впливом активатора вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму кофеїну, блокатора транспортних Ca^{2+} -АТФаз бутилгідроксигінону та блокаторів потенціалкерованих кальцієвих каналів дилтіазему і ніфедипіну.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Ізольовані слинні залози личинки *Chironomus plumosus* L. інкубували у базовому та дослідних розчинах протягом 30 хв при кімнатній температурі (22° С). Базовий зовнішньоклітинний розчин містив (ммоль/л): NaCl – 136,90, KCl – 5,36, CaCl_2 – 1,76, Na_2HPO_4 – 0,35, KH_2PO_4 – 0,44, глюкоза – 5,55; pH 7,2. Для активації вивільнення Ca^{2+} з ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин до базового розчину додавали кофеїн у концентрації 4 ммоль/л, а для інгібування роботи Ca^{2+} -помп – бутилгідроксигінон у концентрації 25 мкмоль/л. Потенціалкеровані кальцієві канали активували гіперкалієвою деполяризацією мембрани, збільшуючи $[\text{K}^+]_o$ до 40 ммоль/л. Для дослідження змін вмісту мембрано-зв'язаного Ca^{2+} під впливом блокаторів потенціалкерованих кальцієвих каналів до базового та гіперкалієвого розчинів додавали дилтіазем (0,1 ммоль/л) або ніфедипін (0,1 ммоль/л).

Після цього залози 20 хв фарбували ХТЦ (2 мкмоль/л), який додавали у розчини інкубації. Після відмивання залоз від барвника визначали інтенсивність флуоресценції у різних їхніх мікроділянках за допомогою цитофлуориметра ЛЮМАМ-Р-3 (Росія) при збільшенні 10×7 з діаметром щілини 0,5 мм й інтерференційним фільтром $\lambda_{\text{max}} = 541 \pm 12$ нм.

Статистичне опрацювання даних здійснювали з використанням програмного пакету для персональних комп'ютерів Microsoft Excel, достовірність змін встановлювали за t-критерієм Стюдента [7].

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Слинна залоза личинки хірономусу належить до малоклітинних залоз з великими за розмірами секреторними клітинами [8]. Незначні розміри залоз, в яких розрізняють кілька часток, дозволяють порівнювати інтенсивність флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу у різних її ділянках.

Перш за все потрібно зазначити, що флуоресценція більш інтенсивною була в ділянці цитоплазми навколо ядра і біля зовнішньої (базальної) поверхні мембрани, менш інтенсивною – в ділянці ядра, і найменш інтенсивною – в ділянці секреторної порожнини. Крім того, інтенсивність флуоресценції у сусідніх

клітинах досить часто суттєво відрізнялася, що свідчить про різний рівень вмісту в них кальцію. Для того, щоб виявити можливу закономірність, робили 3-6 вимірювань інтенсивності флуоресценції клітин кожної частки і розраховували середньоарифметичне значення. Але оскільки статистично-достовірної різниці між вмістом мембрано-зв'язаного Ca^{2+} у клітинах різних часток залози не виявилось [9], то ми спочатку розраховували середньоарифметичне значення інтенсивності флуоресценції від залози і, використовуючи його, – середньоарифметичну інтенсивність флуоресценції від залоз певної серії досліджень.

Крім наведеного, ми застосували також й інший, альтернативний, метод обчислення, який полягає в усередненні показів певної серії досліджень. Як свідчать результати (табл. 1, 2), середньоарифметичне значення інтенсивності флуоресценції (М), розрахованої двома способами, суттєво не відрізняється. Стандартна похибка (m) при альтернативному обчисленні є дещо меншою за рахунок більшого значення n, тому і розрахована достовірність помилкової оцінки (P) є меншою. За умови, що різниця змін інтенсивності флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу є великою (табл. 1), це принципового значення немає, коли ж різниця змін – незначна (табл. 2), обчислення краще здійснювати альтернативним способом.

Таблиця 1. Зміна вмісту мембрано-зв'язаного Ca^{2+} у слинних залозах під впливом блокаторів потенціалкероаних кальцієвих каналів

Умови вимірювань	Інтенсивність флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу (ум. од.)	
	усереднені результати вимірювань від усіх часток залози	усереднені покази серії
Контроль 5,36 K ⁺ 40 K ⁺	24±5, n=6 88±8, n=10, P=3,52·10 ⁻⁵	24±2, n=96 91±3, n=146, P=8,67·10 ⁻³⁹
Дилтіазем 5,36 K ⁺ 40 K ⁺	37±6, n=8 72±6, n=9, P=7,03·10 ⁻⁴	37±2, n=129 71±2, n=139, P=2,65·10 ⁻²¹
Ніфедипін 5,36 K ⁺ 40 K ⁺	52±7, n=10 53±5, n=9, P=0,88	51±2, n=163 52±2, n=138, P=0,83

Таблиця 2. Зміна вмісту мембрано-зв'язаного Ca^{2+} у слинних залозах під впливом кофеїну, бутилгідроксикінону та кофеїну на фоні бутилгідроксикінону

Умови вимірювання	Інтенсивність флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу (ум. од.)	
	усереднені результати вимірювань від усіх часток залози	усереднені покази серії
Контроль	59±7, n=10	61±2, n=192
Кофеїн	73±10, n=11, P [*] =0,28	79±3, n=231, P [*] =1,81·10 ⁻⁶
Бутилгідроксикінон	69±6, n=10, P [*] =0,29	71±2, n=188, P [*] =2,74·10 ⁻⁴
Бутилгідроксикінон+ кофеїн	58±7, n=10, P ^{**} =0,24	59±2, n=202, P ^{**} =1,77·10 ⁻⁶

Примітки: * – достовірність помилкової оцінки відносно контролю, ** – відносно бутилгідроксикінону

За гіперкалієвої деполяризації мембрани вміст мембрано-зв'язаного Ca^{2+} суттєво збільшувався (табл. 1). Це корелює із збільшенням його сумарного вмісту у тканині залози, який визначали за допомогою арсеназо III [10], і зумовлено, очевидно, активацією потенціалкероаних кальцієвих каналів. Коли ж до базового розчину додавали дилтіазем або ніфедипін у вказаних в методиці концентраціях, збільшення інтенсивності флуоресценції було спричинене, мабуть, люмінесценцією цих речовин, оскільки під їх впливом вміст Ca^{2+} у тканині залоз, визначений з використанням арсеназо III, дещо зменшувався [10]. Тому ми аналізували лише вплив цих речовин на стимульоване гіперкалієвою деполяризацією збільшення флуоресценції, а не на абсолютне її значення.

З'ясувалося, що стимульована гіперкалієвим середовищем зміна інтенсивності флуоресценції Ca^{2+} -ХТЦ-комплексу збільшувалася у контролі у 3,68 разів, а під впливом дилтіазему – лише у 1,96 разів. За наявності ніфедипіну у середовищі стимульованого гіперкалієвим розчином збільшення вмісту мембрано-зв'язаного Ca^{2+} практично не спостерігалось. Наведені нами результати ми розцінюємо як одне з доведень надходження Ca^{2+} в клітини через потенціалкероани кальцієві канали плазматичної мембрани.

Під впливом блокатора активного транспорту Ca^{2+} бутилгідроксикінону вміст мембрано-зв'язаного Ca^{2+} (табл. 2) дещо збільшувався за рахунок пригнічення Ca^{2+} -помпи плазматичної мембрани. Кофеїн

Дослідження Ca^{2+} -транспортних систем секреторних клітин ...

спричинив збільшення вмісту мембрано-зв'язаного Ca^{2+} у досліджуваних залозах у 1,29 разів (табл. 2). Аналогічне збільшення було виявлене нами під час дослідження з використанням арсеназо III кофеїн-стимульованих змін загального вмісту Ca^{2+} у тканині залози, яке, як з'ясувалося, зумовлене зміною функціонального стану транспортних Ca^{2+} -АТФаз. Це підтверджується тим, що на фоні бутілгідроксінону кофеїн призводить не до збільшення, а до зменшення вмісту мембрано-зв'язаного Ca^{2+} за рахунок, очевидно, вивільнення його з ендоплазматичного ретикулуму кофеїн(ріанодин)чутливими кальцієвими каналами та виведення у позаклітинне середовище Na^{+} - Ca^{2+} -обмінником плазматичної мембрани.

ВИСНОВКИ

Використання флуоресцентних зондів, зокрема ХТЦ, дає змогу вивчати функціонування Ca^{2+} -транспортних систем як плазматичної, так внутрішньоклітинних мембран не лише в суспензії їхніх везикул, як це практикувалося тривалий час, але і в окремих клітинах тканини чи органу. Зокрема, його можна використовувати для дослідження властивостей потенціалкерованих кальцієвих каналів, Ca^{2+} -помпи і Na^{+} - Ca^{2+} -обмінника плазматичної мембрани, а також кофеїн(ріанодин)чутливих кальцієвих каналів ендоплазматичного ретикулуму секреторних клітин малоклітинних травних залоз.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Caswell H.H. // J. Membr. Biol. 1972. Vol. 7. P. 345-364.
2. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е. Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран. М.: Наука, 1980. 320 с.
3. Зинченко В.П., Теплова В.В., Евтодченко Ю.В. // Бюл. эксперим. биологии и медицины 1985. Т. 11. С.563-565.
4. Рыбальченко В.К. Плазматическая мембрана гладкомышечной клетки: активный транспорт кальция, натрий-кальциевый обмен и реконструкция ионной проводимости: Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. М., 1988. 50 с.
5. Костерин С.А. Транспорт кальция в гладких мышцах. К.: Наукова думка, 1990. 213 с.
6. Чурина С.К., Янушкевич Т.С., Самойлов М.О. и др. // Физиол. журн. СССР. 1991. 77, № 4. С. 41-45.
7. Деркач М.П., Гумецкий Р.Я., Чабан М.Е. Курс варіаційної статистики. К.: Вища школа, 1977. 206 с.
8. Соколова Н.Ю. Мотыль *Chironomus plumosus* L. (Diptera, Chironomidae). Систематика, морфология, экология, продукция. М.: Наука, 1983. 309 с.
9. Клевець М.Ю., Король Т.В., Манько В.В., Федірко Н.В. Докази надходження кальцію у клітини слинної залози личинки хірономусу під впливом гіперкалієвої деполяризації мембрани / Львів. ун-т. Львів, 1997. 20 с. Укр. Деп. в Укр. ІНТЕІ 8.09.97, N 524-Уі 97.
10. Король Т., Манько В., Клевець М. // Галицький лікарський вісник. 1998. Т. 5, № 3. С. 46-48.

БІОФІЗИКА КЛІТИНИ

УДК 577.354+577.352.5+593.711

**РОЛЬ ГЛЮТАМАТНИХ ТА ГАМК РЕЦЕПТОРІВ
У РЕГУЛЯЦІЇ ЕЛЕКТРИЧНОЇ АКТИВНОСТІ ЕПІТЕЛІАЛЬНО-М'ЯЗОВИХ
КЛІТИН HYDRA OLIGACTIS PALLAS****І.О.Проць, Р.В.Тизьо, Д.І.Санагурський***Львівський національний університет ім.Івана Франка
кафедра біофізики та математичних методів в біології
м.Львів, вул.Грушевського, 4*

У роботі представлено результати експериментальної перевірки наявності глютаматних та γ -аміномасляних (ГАМК) рецепторів на клітинах прісноводної гідри *Hydra oligactis Pallas*. Об'єкт досліджень дозволяє на клітинному рівні вивчати роль даних рецепторів у регуляції пачкової електричної активності під впливом специфічних інгібіторів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: гідра, мікроелектродна техніка, глютаматні рецептори, ГАМК рецептори.

Відомо, що у нервовій системі хребетних та безхребетних тварин іонотропні ГАМК рецептори відповідають за гальмування електричної активності, а глютаматні рецептори - за процеси збудження [1]. Показано, що у хребетних іонотропні ГАМК_A рецептори провідні для іонів Cl^- , а глютаматні рецепторні канали, які поділяються на N-метил-D-аспартат (NMDA) та не-NMDA типи проникні тільки для потоку катіонів. Електрофізіологічні дослідження на клітинах безхребетних (зокрема, м'язах сарани) свідчать про наявність подібних двох типів рецепторів [2,3]. Щодо нейронів кишково-порожнинних, наприклад, абдомінальних гангліїв молюсків *Aplisia californica*, було продемонстровано сильну гіперполяризацію, яка супроводжувалась потоком іонів Cl^- , а також сильну деполаризацію при натрієвій провідності та повільнішу гіперполяризацію при калієвій провідності [4].

Тіло прісноводної гідри складається з таких відділів як перистом, щупальці, тулуб, стебельце і підшва [5]. Примітивна нервова система гідри представлена екто- та ентодермальним плексусом мультиполярних нейронів, які не утворюють гангліїв або вузлів [6].

Невідомо, чи існують синаптичні контакти між нервовими клітинами гідри і якого вони є типу. Однак, згідно з даними П'єробона і співавторів [7] у гомогенаті клітин гідри виявлено ГАМК-зв'язуючий сайт, що є характерним для гама-аміномасляних рецепторів, які наявні у центральній нервовій системі вищих тварин. На підставі ряду фармакологічних тестів автори роблять висновок про наявність ГАМК-рецепторів в тканинах гідри, які задіяні в модуляції відповіді на хімічну стимуляцію [7,8].

Метою нашої роботи є виявлення даних рецепторів *in vivo* мікроелектродним методом з використанням специфічних блокаторів глютаматних і ГАМК_A рецепторів.

Дана робота розширює наші уявлення про механізми передачі збудження в тканинах кишковопорожнинних і дозволяє класифікувати тип нейрональних контактів прісноводної гідри.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Об'єктом наших досліджень були епітеліально-м'язові клітини ектодерми *Hydra oligactis Pallas*. Вихідне культуральне середовище та осовні зовнішньоклітинні розчини, які готувались на його основі, містили такі складники (ммоль/л): NaCl - 30, KCl - 1,0, CaCl_2 - 1.5, MgCl_2 - 0.25, NaHCO_3 - 1.0, EDTA - 0.25; pH = 7.8 [9]. Мембранний потенціал спокою та спонтанну електричну активність відводили за стандартною мікроелектродною методикою [10]. Ми використали блокатор NMDA рецепторів - D 2-аміно-5-фосфонопентанату (Dl-APV) у концентрації 10 мМ, блокатор L аміно 3-гідрокси-5 метил-4 ізоксалон пропіонату (AMPA) рецепторів - 6-ціано-мітроквіноксалин-2,3-діон (CNQX) (10 мМ) та блокатор ГАМК рецепторів бікукулін (10 мМ). Заміну робочих розчинів і їх відмивання під час експерименту здійснювали за допомогою проточної системи з швидкістю 0,5 мл/хв з використанням перистальтичної помпи.

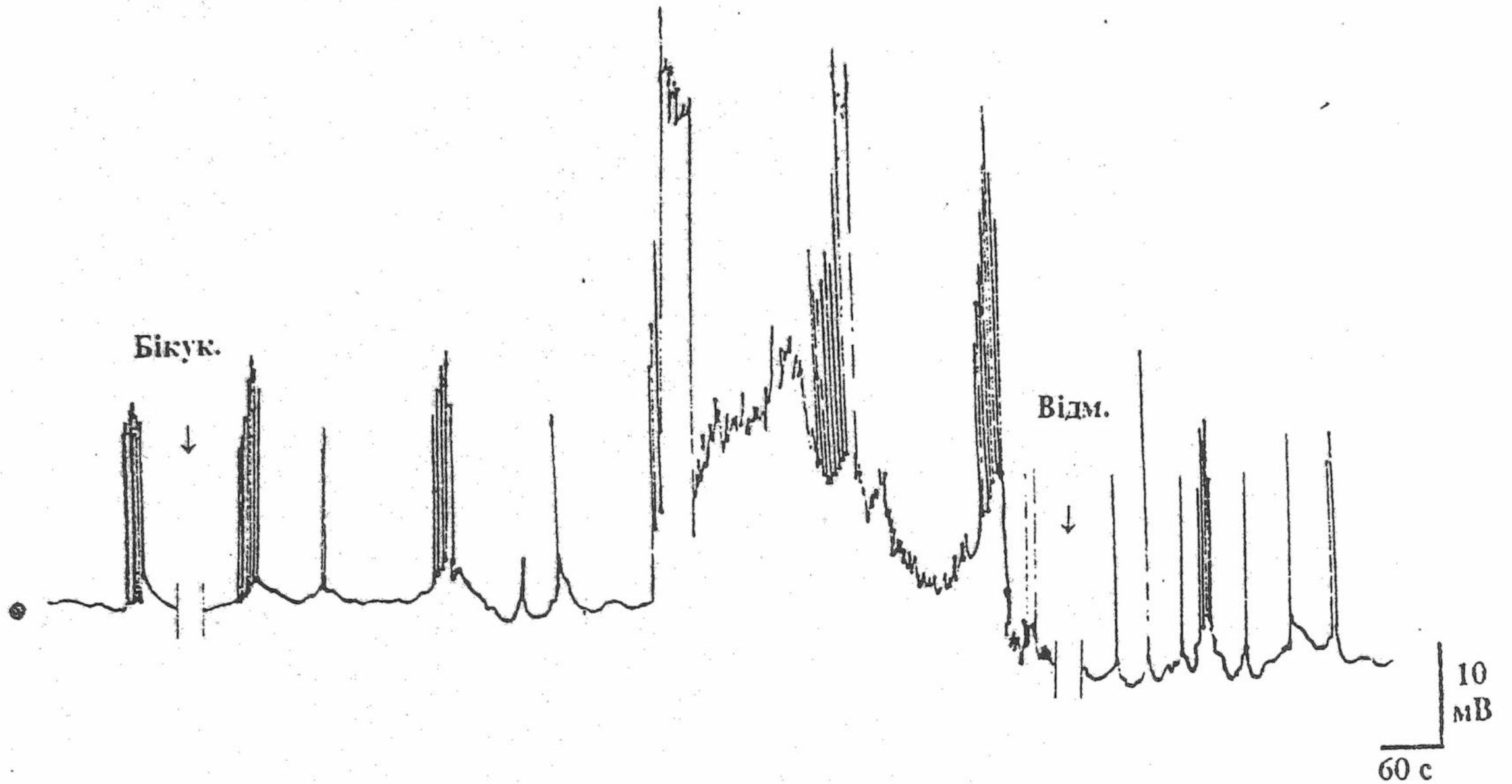


Рис.1. Зміна пачкової електричної активності клітин ектодерми під впливом бікукуліну (10 mM). Точкою позначено величину потенціалу спокою (-37 мВ). Стрілки вказують на початок дії блокатора та початок відмивки.

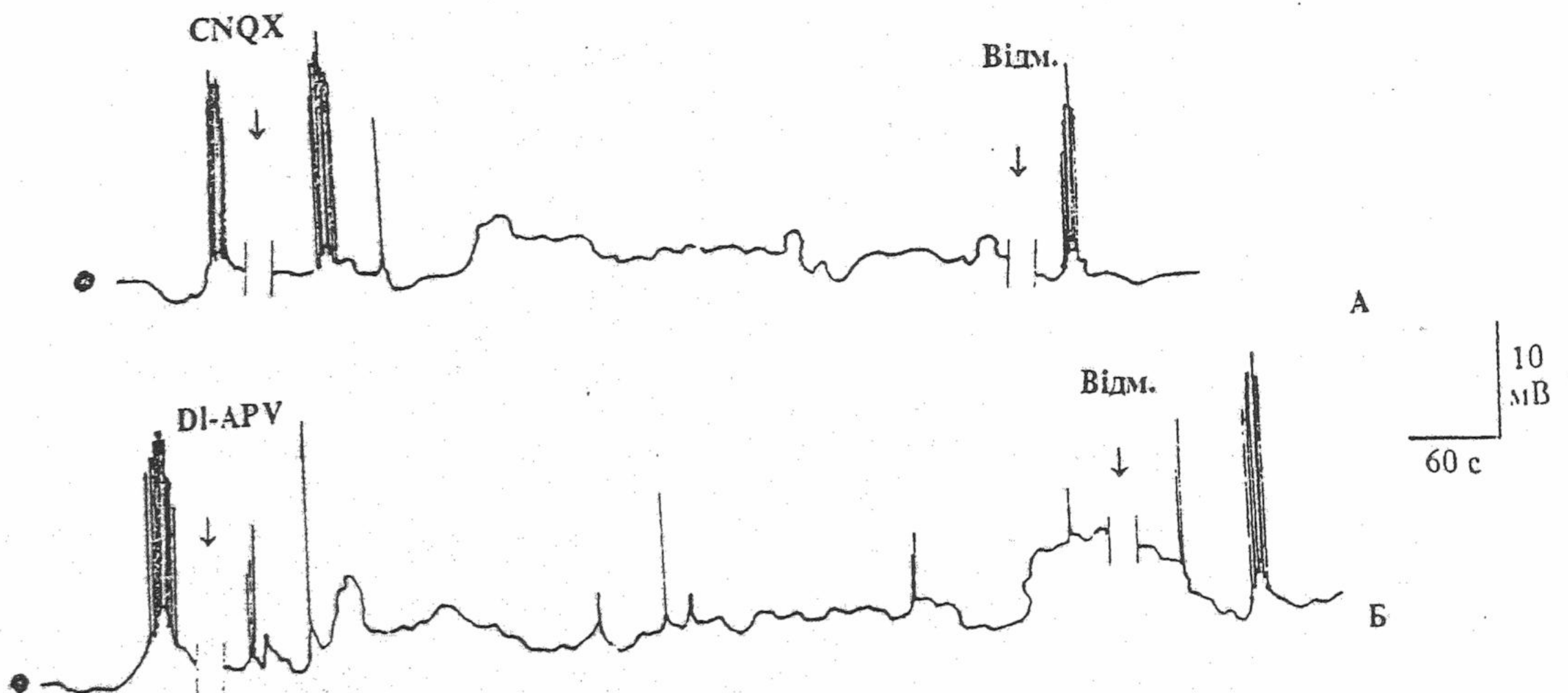


Рис.2. Зміни пачкової електричної активності клітин ектодерми під впливом: (А) CNQX (10 mM) і (Б) DI-APV (10 mM). Точками позначено величину потенціалу спокою: (А) -41 мВ, (Б) -39 мВ. Стрілки вказують на початок дії блокатора та початок відмивки.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

Досліджуючи зміни електричної активності клітин гідри під дією бікукуліну, DІ-APV, CNQX, початково фіксували контроль (5-10) серій пачкової електричної активності при якому мембранний потенціал спокою становив $-37,5 \pm 2$ мВ, амплітуда потенціалів дії $-19,4 \pm 0,5$ мВ, кількість потенціалів дії в середньому 7, а тривалість пачки 10 с, міжпачковий інтервал тривав 2,4 хв. Аплікація блокаторів тривала 5 хв, відмивка - протягом 25-30 хв.

Встановлено, що аплікація бікукуліну в концентрації 10 мМ спричинює розлад пачкової електричної активності і збільшує амплітуду потенціалів дії (рис.1). Спостерігалась деполяризація мембрани від $-37 \pm 0,2$ до $-25 \pm 0,4$ мВ, амплітуда потенціалів дії сягала від $-19,5 \pm 0,2$ до $-35 \pm 0,3$ мВ. При аплікації бікукуліну зростала рухова активність гідри. Такий ефект бікукуліну вдавалось усунути шляхом відмивки протягом 35 хв. Через 20 хв післяпочатку відмивки бікукуліна починає відновлюватись пачкова електрична активність (ПЕА), кількість потенціалів дії при цьому зменшується у порівнянні з контролем. Через 30 хв наступало повне відновлення ПЕА.

Нами з'ясовано, що CNQX (10мМ) - спричинює блокування генерації потенціалів дії повністю, з наступною відмивкою (рис.2А). Під час дії даного блокатора фізіологічні показники гідри суттєво не змінювались. Відмивка тривала 25 хв, при цьому спостерігалось зменшення кількості потенціалів дії від 7 до 4,1. Пачкова електрична активність відновлювалась через 20 хв.

Дія DІ-APV у концентрації 10 мМ спричинювала блокування генерації потенціалів дії частково (рис.2Б). Спостерігалась серія поодиноких потенціалів дії амплітудою $-16 \pm 0,3$ мВ. Відмивка нормальної пачкової електричної активності відбувалась протягом 20 хвилин.

Спільна дія блокатора NMDA рецепторів - DІ-APV та блокатора AMPA рецепторів CNQX спричинює повне блокування генерації потенціалів дії.

ВИСНОВКИ

Отже, нами отримано електро-фізіологічні докази наявності ГАМК та глутаматних рецепторів на клітинах *Hydra oligactis* Pallas. Можна стверджувати, що ГАМК рецептори гідри беруть участь у гальмуванні електричної активності, AMPA та NMDA - у процесах збудження.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Mark G.Darlison. Invertebrate GABA and glutamate receptors: molecular biology reveals predictable structures but some unusual pharmacologies.// TISN. - Vol.15, # 12.- 1992.
2. Piek T. (1985) in Comprehensive Insect Physiology Biochemistry and Pharmacology. Vol.11, Nervous System: Structure and Motor Function (Kerkut G.A., and Gilbert L.I., eds), pp 55-118, ergi H.lamon Press.
3. Shinozak988.//Prog.Neurobiology.-Vol.30, - P.399-435
4. Yarovsky P.J. and Carpenter D.O. 1978.//J.Neurophysiology #41, P.531-541.
5. Липин А.Н. Пресные воды и их жизнь. - М.: гос. уч.- пед. изд-во Мин. Просв. РСФСР, 1950. - С. 172-173.
6. Хадорн Э., Венер Р. Общая зоология. - М.: Мир, 1989. - С.352-354.
7. Pierobon P., Concas A., Santoro G., Marino G., Minei R., Pannacione A., Mostallino MC., Biggio G. Biochemical and functional identification of GABA receptors in *Hydra vulgaris* // Life science. Italy.1995.- Vol.56 (18).-P.1495-97.
8. Concas A., Pierobon P., Mostallino MC., Porcu P., Marino G., Minei R., Biggio G. Modulation of gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors and the feeding response by neurosteroids in *Hydra vulgaris*.// Neuroscience. 1998. - Aug.85 (3).- P.979-88.
9. Kass-Simon G., Diesl V.K. Spontaneous and evoked potentials from dissociated epithelial cells of *Hydra*// Nature, Lond.-1977.-Vol.256.-P.75-77.
10. Первис Р. Микроэлектродные методы внутриклеточной регистрации и ионофореза - Москва: Мир, 1983. - 208 с.

УДК 615.849.19

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

ЧИСЛОВЕ МОДЕЛЮВАННЯ ЛАЗЕРНОЇ ТЕРМОТЕРАПІЇ ПУХЛИН ГОЛОВНОГО МОЗКУ

О.В.Кононов, М.В.Кононов, М.К.Новоселець, І.М.Палій

Національний Університет імені Тараса Шевченка, радіофізичний факультет, кафедра медичної радіофізики, НВП "Інтермаг", проспект академіка Глушкова, 6, Київ 03127, nmk@mail.univ.kiev.ua,

Надійшла до редакції 10 березня 2000 р.

Розглянуто принципи числового моделювання лазерної термодеструкції пухлин головного мозку з метою програмного забезпечення лікарського персоналу і створення умов для комп'ютерного планування оперативного втручання. Описано дифузію тепла та світла в біологічній тканині, комбіновану модель джерела нагріву (коли випромінювання в зоні операції являє собою суму первинного і розсіяного лазерного випромінювання), обґрунтовано вибір схеми і методу розв'язання рівнянь теплопровідності та переносу з урахуванням особливостей задачі. Програми, що реалізують алгоритми розв'язання рівнянь розроблено за допомогою мови програмування C++; класи програм взаємодіють з інтерактивною графічною оболонкою, що надає можливість керувати процесом розв'язування та візуалізувати розрахунки теплових полів. В результаті комп'ютерного моделювання задачі визначено, що ефективне лікування можливе при малих потужностях як неперервного, так і імпульсного лазера.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: лазер, термотерапія, випромінювання, дифузія, тепло, світло, коагуляція,

Останнім часом активно розробляються і впроваджуються в клінічну практику методи лікування пухлинних утворень шляхом термічного впливу на клітини пухлини [1]. Одним з таких методів є метод лазерної термотерапії [2], при якому термічний вплив здійснюється завдяки поглинанню енергії лазерного променя при опромінюванні пухлини. Як правило, клітини пухлини гинуть при досягненні деякої критичної температури, і ефективність лікування залежить від розподілу температур в зоні втручання. Тому, при практичному застосуванні таких методів існує потреба в розрахунках поля температур як всередині пухлини, так і в оточуючих її здорових тканинах мозку. Це необхідно для визначення ефективної тактики лікування, коли досягається максимальне знищення клітин пухлини при мінімальному впливі на здорові тканини.

Виконати такі розрахунки можливо шляхом розв'язання рівняння теплопровідності для модельної задачі. Складність цих розрахунків полягає в залежності фізичних характеристик біологічних тканин від температури, та необхідності врахування значного тепловідводу за рахунок кровообігу, який може суттєво відрізнятися для уражених і здорових тканин, що призводить до просторової залежності коефіцієнтів моделі. Окрім цього, розповсюдження лазерного випромінювання в поглинаючому оптичному середовищі призводить до нетривіальної просторової залежності функції джерела теплової енергії. Тому для вирішення цієї задачі потрібно застосовувати чисельні методи.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ. ДИФУЗІЯ ТЕПЛА.

Схема лазерної термотерапії умовно показана на рис.1. В середину пухлини вводиться голка аплікатора - хірургічного інструменту, через який у зону втручання подається лазерне випромінювання. Аплікатор являє собою металеву порожнисту циліндричну трубку, біля стінок якої циркулює охолоджуюча рідина. В середині трубки проходить світловідвід. На передньому зрізі трубки аплікатора розташована оптична насадка (лінза, обертаюча призма, або розсіювач), що формує геометрію поля опромінювання. В результаті поглинання випромінювання відбувається нагрів тканин пухлини, і, коли температура досягає критичної $T_{кр}$ [3], клітини пухлини гинуть. Позначимо замкнену у просторі область, що охоплює зону втручання, як $\tilde{V}^n$. Її межа $\Gamma = \partial\tilde{V}^n$ складається з віддаленої межі Γ_∞ та поверхні аплікатора $\Gamma_A + \Gamma_B$. Віддалена межа вибирається так, щоб біля її поверхні нагрівом тканин можна було знехтувати. Вісь аплікатора вважається направленою вздовж осі Z.

Розповсюдження тепла в тканинах мозку насичених кровоносними судинами описується квазілінійним (з гладкою залежністю коефіцієнтів від температури) рівнянням теплопровідності з додатковим членом $B_V(T - T_0)$ [4], який враховує додатковий об'ємний тепловідвід за рахунок кровообігу:

$$C_V \frac{\partial T}{\partial t} = \tilde{\nabla}(\lambda \tilde{\nabla} T) - B_V(T - T_0) + F, \quad (1)$$

де $T(\vec{r}, t)$ - температура в точці $\vec{r}$, $C_V(\vec{r}, T)$ - об'ємна теплоємність, $\lambda(\vec{r}, T)$ - коефіцієнт теплопровідності, $B_V(\vec{r}, T)$ - коефіцієнт об'ємного тепловідводу, T_0 - температура крові, $F(\vec{r}, t)$ - функція

джерела нагріву (у більшості випадків вона не залежить від часу t).

Для отримання динаміки розподілу температур в зоні операції необхідно розв'язати рівняння (1) в $n+1$ -вимірній області $\tilde{W}^{n+1} = \tilde{V}^n \otimes t^+$, t^+ - додатня частина осі часу. Крайові умови на поверхні аплікатора визначаються його конструкцією, і у випадку примусово охолоджуваного аплікатора являють собою крайові умови 3-го роду:

$$\lambda \frac{\partial T}{\partial \Gamma} \Big|_{\Gamma} = B_{\Gamma}(T - T_0) \Big|_{\Gamma}, \quad \Gamma = \Gamma_A, \Gamma_B, \quad (2)$$

де B_{Γ} - коефіцієнт теплопереносу через стінку аплікатора. На віддаленій межі доцільно застосувати ізотермічні крайові умови

$$T|_{\Gamma} = T_0|_{\Gamma}, \quad \Gamma = \Gamma_{\infty}, \quad (3)$$

тому, що теплова хвиля майже не досягає цієї межі.

Початкові умови в області $\tilde{V}^n$:

$$T(\vec{r}, t = 0) = T_0, \quad \vec{r} \in \tilde{V}^n \quad (4)$$

визначаються нормальною температурою відповідного органу.

В разі, коли направленість лазерного променя на виході аплікатора має циліндричну симетрію відносно осі Z , а урвжені та здорові тканини мають однакові теплофізичні властивості, загальне 3-вимірне рівняння (1) замінюється рівнянням

$$C_V \frac{\partial T}{\partial t} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[r \lambda \frac{\partial T}{\partial r} \right] + \frac{\partial}{\partial z} \left[\lambda \frac{\partial T}{\partial z} \right] - B_V(T - T_0) + F \quad (1a)$$

у 2-вимірних циліндричних координатах.

У випадку незмінної потужності лазерного випромінювання незалежна від часу функція джерела $F(\vec{r})$ може бути задана у табличному вигляді, як результат експериментальних вимірів на моделі-фантомі. Для деяких простих оптичних насадок функцію джерела нагріву можна обчислити за формулою

$$F(\vec{r}) = k_a c U(\vec{r}), \quad (5)$$

де k_a - коефіцієнт поглинання випромінювання; c - швидкість світла; $U(\vec{r})$ - густина енергії випромінювання у точці $\vec{r}$, розрахована на підставі законів геометричної оптики у наближенні прозорого поглинаючого середовища. Для точкового джерела світла функція джерела нагріву має вигляд (P_0 - потужність випромінювання):

$$F(\vec{r}) = k_a \frac{P_0}{2\pi|\vec{r}|^2} \exp(-k_a|\vec{r}|) \quad (6)$$

Для виходу лазерного променя зі зрізу одномодового світловода, коли формується гаусів світловий пучок [5]:

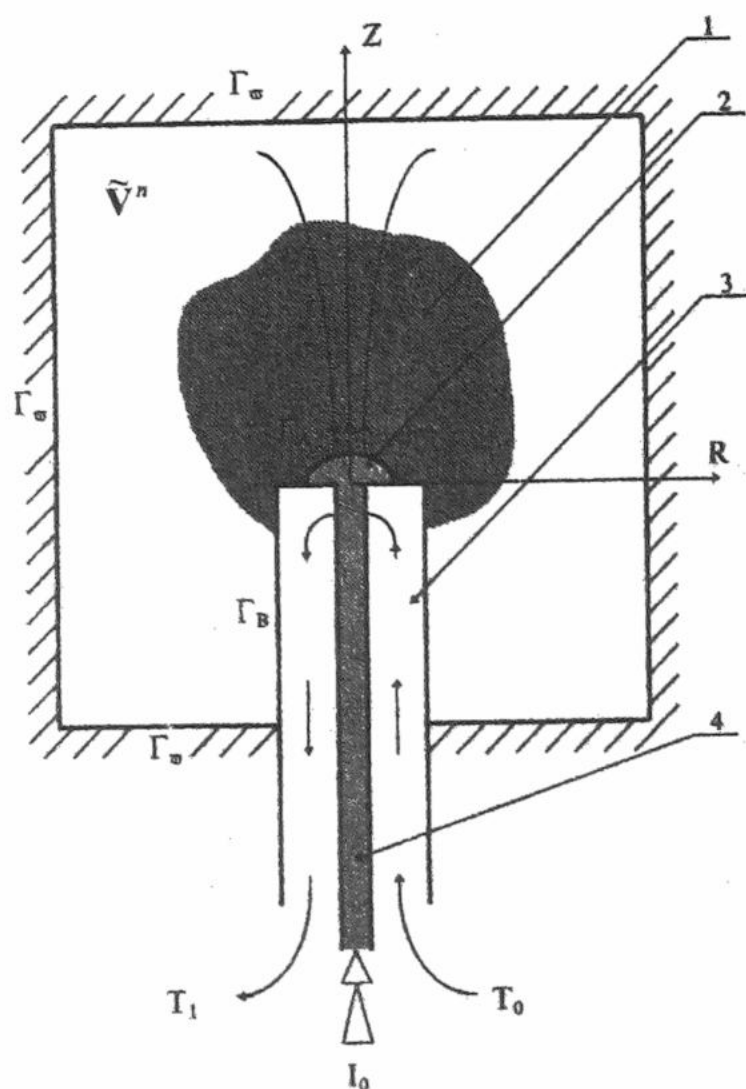


Рис. 1. Схема обчислення теплових полів при лазерній термотерапії. 1 - пухлина, 2 - оптична насадка, 3 - аплікатор, 4 - світловод, T_0 - охолоджуюча рідина, I_0 - лазерне випромінювання.

$$F(\vec{r}) = k_a \frac{2P_0}{\pi a_z^2} \exp\left(-\frac{2(|\vec{r}|^2 - z^2)}{a_z^2}\right) \exp(-k_a |\vec{r}|) \quad (7)$$

$$a_z^2 = a_0^2 + \left(\frac{2\Lambda z}{\pi a_0}\right)$$

де a_0 - ефективний діаметр світловода, Λ - довжина хвилі лазерного випромінювання.

У випадку матової пластинки (освітлювач з ізотропним розподілом яскравості) апроксимацію функції джерела нагріву можна вивести на підставі закону Ламберта $I(\varphi) \sim \cos(\varphi)$ [6], відкоректованого з врахуванням поглинання:

$$F(\vec{r}) = k_a \frac{P_0}{\pi |\vec{r}|^2} \frac{z}{|\vec{r}|} \exp(-k_a |\vec{r}|) \quad (8)$$

Нажаль, більшість біологічних тканин (і мозок у тому числі) не є оптично прозорими. Для них характерні досить високі коефіцієнти дифузного розсіювання світла, якими не можна знехтувати [7], і розглянуте наближення не діє - прості вирази (6), (7), (8) не відповідають дійсному просторовому розподілу функції джерела нагріву. Тому для моделювання функція джерела нагріву необхідно розв'язати окрему задачу розповсюдження світла у біологічній тканині.

ДИФУЗИЯ СВІТЛА

Загальне рівняння переносу

З оптичної точки зору більшість біологічних тканин є мутним, частково прозорим оптичним середовищем зі значним розсіюванням світла. Розповсюдження лазерного світла у такому середовищі описується рівнянням переносу для монохроматичного випромінювання [8]:

$$\frac{1}{c} \frac{\partial I}{\partial t} = -\vec{n} \vec{\nabla} I - (k_a + k_s) I + k_s \int_{4\pi} I(\vec{n}') W(\vec{n}, \vec{n}') d\Omega' + S \quad (9)$$

де c - швидкість світла; $I(\vec{r}, \vec{n}, t)$ - інтенсивність випромінювання (функція розподілу випромінювання у фазовому просторі); $\vec{n}, \vec{n}'$ - одиничний вектор у напрямку розповсюдження; $k_a(\vec{r}, T)$, $k_s(\vec{r}, T)$ - коефіцієнти поглинання та розсіювання випромінювання; $W(\vec{n}, \vec{n}')$ - індикатриса розсіювання; $d\Omega$ - елемент тілесного кута у напрямку розповсюдження; $S(\vec{r}, \vec{n}, t)$ - об'ємне джерело випромінювання (в стандартних задачах $S=0$). Відзначимо, що для біологічних тканин характерні досить значні коефіцієнти поглинання та високі коефіцієнти дифузного розсіювання, індикатриса якого наближується до ізотропної.

При лазерній термотерапії всі важливі процеси відбуваються в часових інтервалах, значно довших у порівнянні з часом встановлення рівноважного розподілу випромінювання $\sim \frac{L}{c} \sim 10^{-9} \div 10^{-10}$ с (L - розмір області операції), і рівняння (9) замінюється на стаціонарне рівняння переносу:

$$0 = -\vec{n} \vec{\nabla} I - (k_a + k_s) I + k_s \int_{4\pi} I(\vec{n}') W(\vec{n}, \vec{n}') d\Omega' \quad (9a)$$

Його розв'язок в області $\vec{V}^n$ з відповідними крайовими умовами вирішує задачу знаходження функції джерела нагріву, якщо в (5) замість $U(\vec{r})$ підставити його вираз через $I(\vec{r}, \vec{n})$:

$$U(\vec{r}) = (1/c) \int_{4\pi} I(\vec{r}, \vec{n}) d\Omega.$$

Зазначимо, що, навіть у разі ізотропної індикатрисы $W=1/4\pi$, рівняння (9a) не має простого аналітичного розв'язку при довільному розподілі світлової потужності на поверхні аплікатора, і необхідно застосувати чисельні методи, що для 5-вимірною (3 просторові і 2 фазові координати) потребує занадто великих витрат

машинного часу. Виходом з такого становища є перехід до дифузійного наближення переносу випромінювання.

Дифузійне наближення.

Скористуємось тим, що у мутному оптичному середовищі індикатриса незначно відрізняється від ізотропної: $W(\vec{n}, \vec{n}') = \frac{1}{4\pi} + O(\varepsilon_W)$. Тоді інтеграл $\int_{4\pi} I W d\Omega'$ можна замінити його наближеним значенням:

$$\int_{4\pi} I W d\Omega' = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} I d\Omega' + \int_{4\pi} I O(\varepsilon_W) d\Omega' = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} I d\Omega' + O(\varepsilon_I \varepsilon_W),$$

де $\varepsilon_I < 1$, $\varepsilon_W < 1$ - відносні середньоквадратичні відхилення інтенсивності та індикатриси від ізотропних (коефіцієнти анізотропії): $\varepsilon_X = \frac{1}{X_0} \sqrt{\frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} [X(\vec{n}) - X_0]^2 d\Omega}$, $X_0 = \frac{1}{4\pi} \int_{4\pi} X(\vec{n}) d\Omega$, і рівняння (9)

переходить в:

$$\frac{1}{c} \frac{\partial I}{\partial t} = -\vec{n} \vec{\nabla} I - (k_a + k_s) I + \frac{1}{4\pi} k_s \int_{4\pi} I(\vec{n}) d\Omega + S + O(\varepsilon_I \varepsilon_W). \quad (10)$$

Рівняння (10) подібне до кінетичного рівняння з функцією розподілу $I(\vec{r}, \vec{n}, t)$, тому для отримання його наближення можна скористатись методом Греда [9]. Позначимо перші моменти функції розподілу як:

$$\text{густина енергії} - U(\vec{r}, t) = (1/c) \int_{4\pi} I(\vec{r}, \vec{n}, t) d\Omega \quad (11)$$

$$\text{густина потоку} - \vec{J}(\vec{r}, t) = \int_{4\pi} \vec{n} I(\vec{r}, \vec{n}, t) d\Omega. \quad (12)$$

Тоді у нульовому порядку розкладу метода Греда для рівняння (10) отримаємо наближену систему рівнянь (подібну до випадку радіаційного переносу рівноважним випромінюванням [10]):

$$\begin{cases} \frac{\partial U}{\partial t} = -\vec{\nabla} \vec{J} - k_a c U + c S_{4\pi} + O(\varepsilon_I \varepsilon_W) \\ \frac{1}{c} \frac{\partial \vec{J}}{\partial t} = -c \vec{\nabla} U - (k_a + k_s) \vec{J} + O(\varepsilon_I \varepsilon_W) \end{cases} \quad (13)$$

де введено позначення $S_{4\pi} = (1/c) \int_{4\pi} S(\vec{n}) d\Omega$. Алгебраїчний розв'язок системи (13) відносно

невідомої U дає наближене рівняння переносу випромінювання:

$$\left(1 + \frac{k_a}{k_a + k_s}\right) \frac{1}{c} \frac{\partial U}{\partial t} = \vec{\nabla} \left(\frac{1}{k_a + k_s} \vec{\nabla} U \right) - k_a U + S_{4\pi}, \quad (14)$$

що має вигляд рівняння дифузії, і апроксимує первинне рівняння (9) з точністю до членів порядку $O(\varepsilon_I \varepsilon_W + \varepsilon_\tau)$, $\varepsilon_\tau = \left[(k_a + k_s) c \tau_{\min} \right]^{-1} \ll 1$, $\tau_{\min}$ - найменший характерний час задачі. При лазерній термотерапії встановлення рівноважного розподілу випромінювання в зоні втручання відбувається значно швидше всіх інших істотних процесів, тому (14) замінюється на стаціонарне рівняння дифузії:

$$\vec{\nabla} \left(\frac{1}{k_a + k_s} \vec{\nabla} U \right) - k_a U + S_{4\pi} = 0. \quad (15)$$

Числове моделювання лазерної термотерапії пухлин ...

В разі, коли направленість лазерного променя на виході аплікатора має циліндричну симетрію відносно осі Z, а уражені та здорові тканини мають однакові оптичні властивості, загальне 3-вимірне рівняння (15) замінюється рівняння

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left[r \frac{1}{k_a + k_s} \frac{\partial U}{\partial r} \right] + \frac{\partial}{\partial z} \left[\frac{1}{k_a + k_s} \frac{\partial U}{\partial z} \right] - k_a U + S_{4\pi} = 0 \quad (15a)$$

у 2-вимірних циліндричних координатах.

МОДЕЛЬ ФУНКЦІЇ ДЖЕРЕЛА НАГРІВУ

Лазерне випромінювання на виході аплікатора є анізотропним ($\epsilon_l = 1$), і при лазерній термотерапії повна інтенсивність (яка дорівнює сумі інтенсивностей лазерного променя і розсіяного світла) в зоні впливу не відповідає умові $\epsilon_l \ll 1$, при якій справедливе дифузійне наближення (15). Тому рівняння (15) не може бути безпосередньо використане для розрахунку повної густини енергії і потужності джерела нагріву (формула (5)).

Для подолання цієї проблеми запропонована комбінована модель, в якій випромінювання в зоні операції розбивається на суму двох частин: первинного анізотропного випромінювання лазерного променя з густиною енергії U_L (анізотропна компонента), та розсіяного випромінювання з густиною енергії U (ізотропна компонента). Просторовий розподіл $U_L(\vec{r})$ анізотропної компоненти розраховується на підставі законів геометричної оптики в поглинаючому середовищі з сумарним коефіцієнтом поглинання $k_\Sigma = k_a + k_s$ (подібно до формул (6), (7)). Далі по формулі $S_{4\pi}(\vec{r}) = k_s U_L(\vec{r})$ обчислюється густина ізотропного джерела розсіяного світла для рівняння (15), розв'язок якого в області $\tilde{V}^n$ з відповідними крайовими умовами дає розподіл густини енергії $U(\vec{r})$ ізотропної компоненти. Отримана таким чином сумарна густина енергії $U_\Sigma(\vec{r}) = U_L(\vec{r}) + U(\vec{r})$ підставляється до формули (5) для обчислення функції джерела нагріву

$$F(\vec{r}) = k_a U_\Sigma(\vec{r}) + k_a \{ U_L(\vec{r}) + U(\vec{r}) \} \quad (16)$$

в рівнянні теплопровідності.

При розв'язанні рівняння (15) на межах $\Gamma_A, \Gamma_B, \Gamma_\infty$ області $\tilde{V}^n$ (Рис.1.) використовуються такі крайові умови: на поверхні оптичного вводу насадки аплікатора

$$U|_\Gamma = 0, \quad \Gamma = \Gamma_A, \quad (17)$$

що відповідає вільному проходженню повернутого із зони опромінення розсіяного світла у прозоре середовище оптичної системи насадки;

на залишку поверхні аплікатора (полірована металева трубка)

$$\frac{1}{(k_a + k_s)} \frac{\partial U}{\partial \Gamma} \Big|_\Gamma = 0, \quad \Gamma = \Gamma_B, \quad (18)$$

що відповідає повному віддзеркаленню світла;

на віддаленій межі застосовується умова самоузгодженого поглинання

$$\frac{1}{(k_a + k_s)} \frac{\partial U}{\partial \Gamma} \Big|_\Gamma = U|_\Gamma, \quad \Gamma = \Gamma_\infty, \quad (19)$$

яка вносить мінімальні збурення в розв'язок рівняння (15) в обмеженій області, порівняно з необмеженим випадком. (Зауважимо, що розмір області розповсюдження тепла вочевидь перевищує розмір дифузії випромінювання, тому умова віддаленості межі для рівняння теплопровідності є, одночасно, і умовою віддаленості межі для рівняння дифузії випромінювання.)

При застосуванні в оптичній насадці ідеального розсіювача (матової пластинки) крайову умову (17) потрібно замінити на

$$\left. \frac{1}{(k_a + k_s)} \frac{\partial U}{\partial \Gamma} \right|_{\Gamma} = \frac{P_0}{cS_{ap}}, \quad \Gamma = \Gamma_A, \quad (17a)$$

де P_0 - повна потужність випромінювання на виході з оптичної насадки, S_{ap} - площа активної поверхні розсіювача; та обнулити густину джерела розсіяного світла $S_{4\pi}(\vec{r}) = 0$.

ВИБІР РІЗНИЦЕВОЇ СХЕМИ І МЕТОДУ ЇЇ РОЗВ'ЯЗАННЯ. РЕАЛІЗАЦІЯ І МОДЕЛІ.

Як у 2-вимірному циліндрично симетричному, так і у 3-вимірному випадках обрано чисто неявну схему та схему Кранка-Нікольсона, які можна записати у матричному вигляді: $Au = f$, (20)
де A - розріджена квадратна матриця різницевої схеми; u - вектор значень невідомої на верхньому часовому шарі; вектор f - сума всіх вільних членів вузла. Для лінійної задачі - A є стала матриця, для нелінійної - матрична функція $A(u)$ від u . Для розв'язання дискретної задачі (20) було використано найбільш універсальний ітераційний метод послідовної верхньої релаксації [11,12]. Матриця $A(u)$ розбивається на суму нижньої трикутної A^- , верхньої трикутної A^+ , та діагональної A_d матриць: $A = A^- + A^+ + A_d$. Розв'язок задачі (20) знаходиться шляхом послідовності ітерацій по рекурентним формулам:

$$\hat{u}^{k+1} = A_d^{-1}(-A^-u^{k+1} - A^+u^k + f) \quad (21)$$

$$u^{k+1} = \omega \hat{u}^{k+1} + (1 - \omega)u^k,$$

де k - номер ітерації, ω - параметр релаксації ($1 \leq \omega < 2$). Ітерації закінчуються, коли евклідова норма $\|u^k - u^{k-1}\|_2$ стає менше наперед заданої величини $\delta u_{\lim}$.

Далі всі індекси вважаються цілими. Верхні індекси t - номер часового шару, k - номер ітерації; нижні індекси r, x, y, z - номери вузлів просторові ґратки різницевої задачі. Введемо позначення:

$F(r, z | T)$ - значення функції $F(r, z, T)$ у вузлі (r, x) ,

$F(r, z | t)$ - значення функції у вузлі (r, x) в момент часу τt ; τ - часовий крок, h - просторовий крок ґратки.

Реалізація чисельного розв'язання рівняння теплопровідності

Для рівняння теплопровідності (1a) у 2-вимірних циліндричних координатах різницева задача (20) записується у явному вигляді як:

$$-A'_{r-1,z} T'_{r-1,z} - A'_{r,z-1} T'_{r,z-1} + A'_{r,z} T'_{r,z} - A'_{r+1,z} T'_{r+1,z} - A'_{r,z+1} T'_{r,z+1} = f_{r,z} \quad (23)$$

де елементи матриці A та вектора f в регулярних вузлах дорівнюють в разі чисто неявної схеми:

$$A'_{r-1,z} = \begin{cases} \frac{\tau}{h^2} \left(1 - \frac{1}{2r}\right) \frac{\lambda(r, z | T'_{r,z}) + \lambda(r-1, z | T'_{r-1,z})}{2C_V(r, z | T'_{r,z})} & ; r \neq 0 \\ 0 & ; r = 0 \end{cases} \quad (24.1)$$

$$A'_{r+1,z} = \begin{cases} \frac{\tau}{h^2} \left(1 + \frac{1}{2r}\right) \frac{\lambda(r, z | T'_{r,z}) + \lambda(r+1, z | T'_{r+1,z})}{2C_V(r, z | T'_{r,z})} & ; r \neq 0 \\ 2 \frac{\tau}{h^2} \frac{\lambda(0, z | T'_{0,z}) + \lambda(1, z | T'_{1,z})}{C_V(0, z | T'_{0,z})} & ; r = 0 \end{cases} \quad (24.2)$$

$$A'_{r,z-1} = \frac{\tau}{h^2} \frac{\lambda(r, z | T'_{r,z}) + \lambda(r, z-1 | T'_{r,z-1})}{2C_V(r, z | T'_{r,z})}, \quad A'_{r,z+1} = \frac{\tau}{h^2} \frac{\lambda(r, z | T'_{r,z}) + \lambda(r, z+1 | T'_{r,z+1})}{2C_V(r, z | T'_{r,z})} \quad (24.3)$$

$$A_{r,z}^t = 1 + A_{r-1,z}^t + A_{r,z-1}^t + A_{r+1,z}^t + A_{r,z+1}^t + \tau \frac{B_V(r,z|T_{r,z}^t)}{C_V(r,z|T_{r,z}^t)} \quad (24.4)$$

$$f_{r,z} = T_{r,z}^{t-1} + \tau \frac{B_V(r,z|T_{r,z}^t)}{C_V(r,z|T_{r,z}^t)} T_0 + \tau \frac{1}{C_V(r,z|T_{r,z}^t)} F(r,z)^t \quad ; \quad (24.5)$$

а в разі схеми Кранка-Нікольсона:

$$A_{r-1,z}^t = \begin{cases} \frac{\tau}{h^2} \left(1 - \frac{1}{2r}\right) \frac{\lambda(r,z|T_{r,z}^t) + \lambda(r-1,z|T_{r-1,z}^t)}{4C_V(r,z|T_{r,z}^t)} & ; r \neq 0 \\ 0 & ; r = 0 \end{cases} \quad (25.1)$$

$$A_{r+1,z}^t = \begin{cases} \frac{\tau}{h^2} \left(1 + \frac{1}{2r}\right) \frac{\lambda(r,z|T_{r,z}^t) + \lambda(r+1,z|T_{r+1,z}^t)}{4C_V(r,z|T_{r,z}^t)} & ; r \neq 0 \\ \frac{\tau}{h^2} \frac{\lambda(0,z|T_{0,z}^t) + \lambda(1,z|T_{1,z}^t)}{C_V(0,z|T_{0,z}^t)} & ; r = 0 \end{cases} \quad (25.2)$$

$$A_{r,z-1}^t = \frac{\tau}{h^2} \frac{\lambda(r,z|T_{r,z}^t) + \lambda(r,z-1|T_{r,z-1}^t)}{4C_V(r,z|T_{r,z}^t)}, \quad A_{r,z+1}^t = \frac{\tau}{h^2} \frac{\lambda(r,z|T_{r,z}^t) + \lambda(r,z+1|T_{r,z+1}^t)}{4C_V(r,z|T_{r,z}^t)} \quad (25.3)$$

$$A_{r,z}^t = 1 + A_{r-1,z}^t + A_{r,z-1}^t + A_{r+1,z}^t + A_{r,z+1}^t + \tau \frac{B_V(r,z|T_{r,z}^t)}{2C_V(r,z|T_{r,z}^t)} \quad (25.4)$$

$$f_{r,z} = T_{r,z}^{t-1} + \tau \frac{B_V(r,z|T_{r,z}^t)}{2C_V(r,z|T_{r,z}^t)} T_0 + \tau \frac{1}{2C_V(r,z|T_{r,z}^t)} F(r,z)^t + \tilde{f}_{r,z} \quad (25.5)$$

$$\begin{aligned} \tilde{f}_{r,z} = & \tau \frac{B_V(r,z|T_{r,z}^{t-1})}{2C_V(r,z|T_{r,z}^{t-1})} T_0 + \tau \frac{1}{2C_V(r,z|T_{r,z}^{t-1})} F(r,z)^{t-1} + \\ & + A_{r-1,z}^{t-1} T_{r-1,z}^{t-1} + A_{r,z-1}^{t-1} T_{r,z-1}^{t-1} - A_{r,z}^{t-1} T_{r,z}^{t-1} + A_{r+1,z}^{t-1} T_{r+1,z}^{t-1} + A_{r,z+1}^{t-1} T_{r,z+1}^{t-1} \end{aligned} \quad (25.6)$$

а в граничних вузлах ці елементи задаються окремо.

У 3-вимірних декартових координатах для рівняння теплопровідності (1) різницеві задачі мають аналогічний вигляд, за винятком відсутності множників $\left(1 \pm \frac{1}{2r}\right)$ у формулах (24.1), (24.2), (25.1), (25.2),

та появи у рівнянні (23) додаткових елементів матриці А для 3-го просторового виміру.

Програми, що реалізують обрані алгоритми для модифікованого рівняння теплопровідності у 2- та 3-вимірному випадках, розроблено з використанням об'єктно-орієнтованого підходу за допомогою мови програмування C++ у вигляді двох головних C_Terlo_2d і C_Terlo_3d, та кількох допоміжних класів. Класи C_Terlo_2d та C_Terlo_3d мають ідентичну функціонально-логічну будову. Схема різницевої апроксимації обирається опціонально через знак керування (якщо не вказано, використовується чисто неявно схема). Теплофізичні коефіцієнти $C_V(T)$, $\lambda(T)$, $B_V(T)$ у вузлах просторової ґратки задаються у вигляді табличних функцій $C_V(r,z|T)$, $\lambda(r,z|T)$, $B_V(r,z|T)$, як екземпляри класу C_TblFunc. Аналогічно задається функція джерела нагріву та коефіцієнти крайових умов. Елементи матриці різницевої схеми в граничних вузлах задаються як екземпляри класу C_Site_2d (C_Site_3d).

Чисельне розв'язання задачі (23) для кожного часового шару виконується методом послідовної верхньої релаксації. Для підвищення швидкості збіжності обхід вузлів ґратки під час ітерації виконується від центру джерела, тобто в напрямку розповсюдження теплової хвилі. На кожній наступній ітерації напрямок обходу вузлів змінюється. При досягненні заданої точності процес ітерацій для даного часового шару припиняється і починається обробка наступного часового шару.

Класи `C_Terlo_2d` та `C_Terlo_3d` взаємодіють з розробленою інтерактивною графічною оболонкою. Оболонка призначена для вводу параметрів задачі, ініціалізації та керування процесом розв'язання, візуалізації результатів розрахунків теплових полів (розподілу температури) в зоні термотерапевтичного втручання, та їх збереження у вигляді послідовності графічних кадрів, що відповідають заданим моментам часу. Візуалізація виконується шляхом перетворення масиву розрахованих для певного моменту часу температур в кадр зображення у вигляді тонової або кольорової карти температур в форматі `bitmap`, критичні температури..... 43 та 80°C позначаються стрибком яскравості і кольорового тону. Можливий перегляд послідовності зображень теплових полів в режимі анімації.

Для перевірки правильності роботи програми було проведено тестування для кількох задач зі сталими коефіцієнтами, які мають відомі аналітичні розв'язки. Це задачі а) рівномірного нагрівання та охолодження з однорідним джерелом та однорідним коефіцієнтом об'ємних втрат B_v , б) розповсюдження тепла вздовж стрижня зі сталим перепадом температур між його краями, в) нагрівання стрижня з локалізованим на осі однорідним джерелом нагріву, г) релаксації розподілу температури, який відповідає фундаментальному розв'язку оператора теплопровідності [13]. Для всіх тестових задач результати чисельного моделювання в межах заданої точності ($0,025^\circ = 0,05\%$) співпали з аналітичними.

Дослідним шляхом уточнено коефіцієнти формули для визначення величини часового кроку по заданій точності для чисто неявної схеми. При типових для біологічних тканин теплофізичних параметрах і точності $\sim 0,1$ градуса часовий крок τ встановлюється в межах $0,1 \div 2$ с при кроці ґратки $0,1 \div 0,2$ мм (кількість вузлів ґратки $\sim 10^4$ у 2-вимірному випадку, та $3 \cdot 10^5 \div 10^6$ у 3-вимірному).

Для виконання однієї ітерації на 2-вимірній ґратці розміром 64×128 на процесорі `Pentium-II-233` потрібно $\sim 0,02$ с. Це дозволяє проводити розрахунки теплових полів при лазерній термотерапії в реальному часі, безпосередньо в ході операції.

Для еквівалентних ґраток розміром 30×60 та $60 \times 60 \times 60$ у 2 та 3 вимірах відповідно було проведено візуальне порівняння результатів для задачі с Ламбертовим джерелом випромінювання. На всьому дослідженому часовому інтервалі 150 с (до встановлення стаціонарного режиму) отримано співпадання просторових розподілів температур з точністю до одного пікселя.

Реалізація чисельного розв'язання рівняння дифузії випромінювання.

Для стаціонарного рівняння дифузії випромінювання (15а) у 2-вимірних циліндричних координатах різницева задача (20) записується в явному вигляді так:

$$-A'_{r-1,z} U'_{r-1,z} - A'_{r,z-1} U'_{r,z-1} + A'_{r,z} U'_{r,z} - A'_{r+1,z} U'_{r+1,z} - A'_{r,z+1} U'_{r,z+1} = f_{r,z} \quad (26)$$

і визначаються елементи матриці A та вектора f в регулярних та межевих вузлах.

У 3-вимірних декартових координатах для стаціонарного рівняння дифузії випромінювання (15) різницева задача має аналогічний вигляд, за винятком появи у рівнянні (26) додаткових елементів матриці A для 3-го просторового виміру.

Чисельне розв'язання задачі (26) виконується методом послідовної верхньої релаксації. Для підвищення швидкості збіжності обхід вузлів ґратки під час ітерації виконується від центру джерела, тобто в напрямку дифузії випромінювання. На кожній наступній ітерації напрямок обходу вузлів змінюється. При досягненні заданої точності процес ітерацій припиняється.

Для перевірки правильності роботи програми було проведено тестування для кількох задач зі сталими коефіцієнтами, які мають відомі аналітичні розв'язки. Це задачі а) поглинання випромінювання в області з однорідним джерелом світла, б) дифузії випромінювання вздовж стрижня зі сталим потоком енергії, в) дифузії випромінювання від сингулярного джерела в необмеженій області. Для всіх тестових задач результати чисельного моделювання в межах заданої відносної точності ($0,05\%$) співпали з аналітичними.

За результатами тестування з реальними функціями джерела випромінювання визначено оптимальне значення параметра релаксації $\omega = 1,85$ для 2-вимірної задачі, та $\omega = 1,4$ для 3-вимірної. При цьому встановлено, що для отримання розв'язку з точністю $\sim 0,1\%$ достатньо $30 \div 60$ ітерацій (у $4 \div 6$ разів менше, ніж при $\omega = 1$).

Числове моделювання лазерної термотерапії пухлин ...

Тестування показало, що в деяких випадках (для дуже великих значень коефіцієнта розсіювання $k_a > 30 \text{ см}^{-1}$) на вторинній ґратці стандартного розміру, просторовий крок якої дорівнює просторовому кроку ґратки для рівняння теплопровідності, через ефекти дискретизації досягти бажаної точності не вдається. Тому в програмі передбачено опціональну можливість використання згущеної вторинної ґратки - зменшення її кроку у два рази дозволяє досягти необхідної точності і в даному випадку. Витрати машинного часу на розрахунок дифузії тепла незначні і у 2-вимірному випадку на процесорі Pentium-II-233 не перевищують 1 с.

РЕЗУЛЬТАТИ МОДЕЛЮВАННЯ

В процесі планування малоінвазивної операції лазерної термодеструкції пухлини головного мозку з використанням розробленої і перевіреної в даній роботі програми можливий добір усіх параметрів лазерної установки і таке їхнє узгодження, що термічний вплив на область пухлини уможливить її знешкодження при мінімальному впливі на здорові тканини.

Експериментально визначено, що теплові параметри тканин мозку визначаються параметрами води - при досягненні температури випаровування води починається й випаровування тканин мозку, що призводить до зміни фізичних властивостей об'єкту моделювання й до фатальних клінічних змін. Саме точковий лазерний випромінювач призводить до величезного перегріву в точці аплікації, тому постає питання використання оптичного розсіювача.

Чисельний експеримент показав, що у випадку неперервного лазерного випромінювання тривалістю 10 або 20 с температура коагуляції 43°C досягається при малих потужностях - 2 Вт і 1 Вт відповідно. Пікові температури при цьому не досягають значень випаровування. Очевидно, що у випадку незмінної потужності область коагуляції розширюється при продовженні терапії (рис. 2).

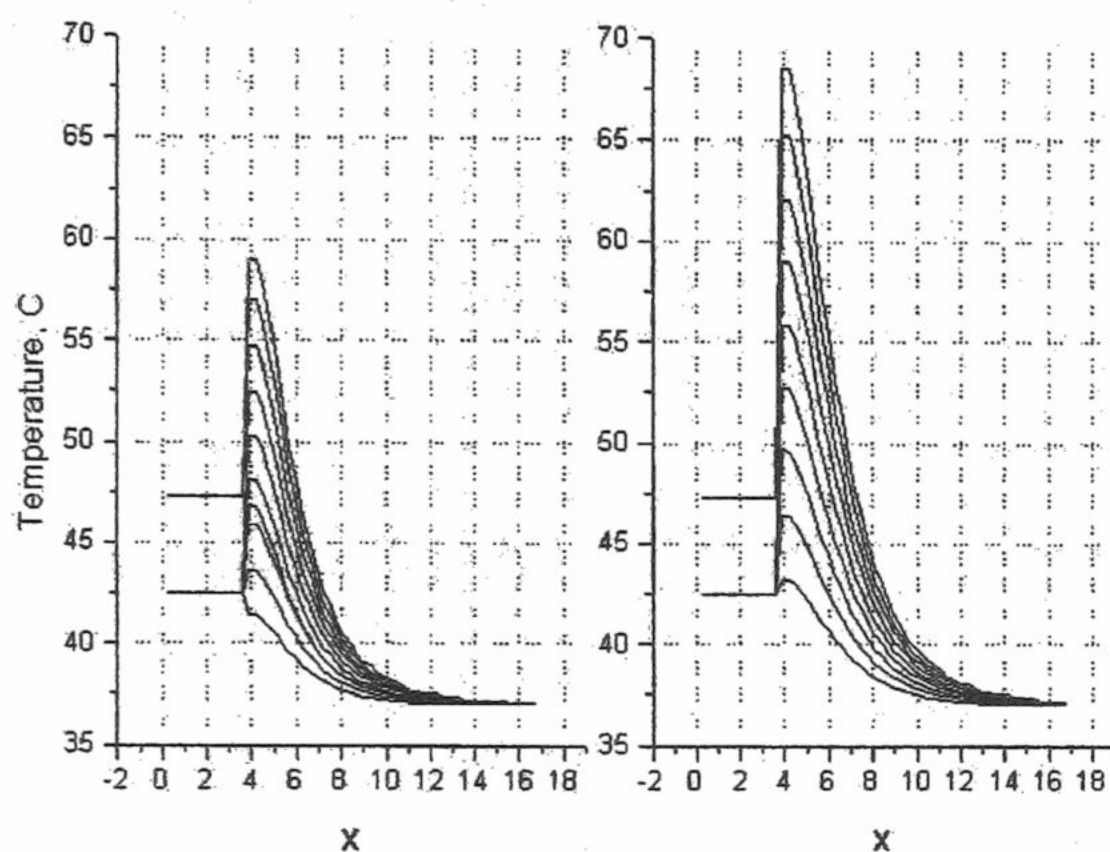


Рис 2. Просторовий розподіл температури в тканинах мозку при термотерапії неперервним лазерним випромінюванням потужностей 1.5 - 6 Вт протягом 10 (а) та 20 (б) с.

Ізотерми, виведені в інтерактивну графічну оболонку в такому вигляді, наочно показують розмір зони термічного впливу і пікової температури, що дозволяє варіюючи потужність лазера (або інші параметри) ефективно моделювати операцію.

На рис. 3 показано залежність відстані від центру аплікатора ізотерми температури коагуляції 43°C від середньої потужності лазерного випромінювання в різних частотних режимах - 1, 2 і 3 Гц. Ці режими істотно не відрізняються один від одного як і показані на рис.4 часові розподіли температури на відстанях 4, 6 та 8 мм від центру аплікатора. Це вказує на те, що результати лазерного впливу не залежать від вибору частоти в практичних межах.

Зростання пікової температури прогріву тканин в залежності від шпаруватості (відношення періоду до тривалості імпульсу) вказує на те, що безпечніше працювати в області малих шпаруватостей принаймні у випадку великих потужностей (рис. 5).

З точки зору клінічної практики певний інтерес представляє можливість терапії одиничними короткими імпульсами, наприклад, дельта-імпульсом (тривалістю 0.01 с), імпульсом тривалістю порядку часу внутрішньоклітинної релаксації 0.2 з або коротким імпульсом тривалістю 1 с. Даний експеримент показав, що використання двох перших типів імпульсів не доцільно, тому що при практично доступних лазерних потужностях у цих випадках не спостерігається ніякого прогріву. Одиничний імпульс тривалістю 1 с призводить до підвищення температури до 41°C при потужності лазера 4 Вт, а коагуляція спостерігається при потужності 6 Вт. При видаленні оптичного розсіювача з кінця аплікатора спостерігається ефективний

прогрів тканин одиничними короткими імпульсами, і температура коагуляції в точці аплікації фіксується вже при найменших потужностях (табл.1)

Збільшення частоти випромінювання спричиняє дуже незначне зменшення пікових температур; та при найменшій потужності у 2 Вт це призводить до того, що температура коагуляції досягається лише за частоти 1 Гц.

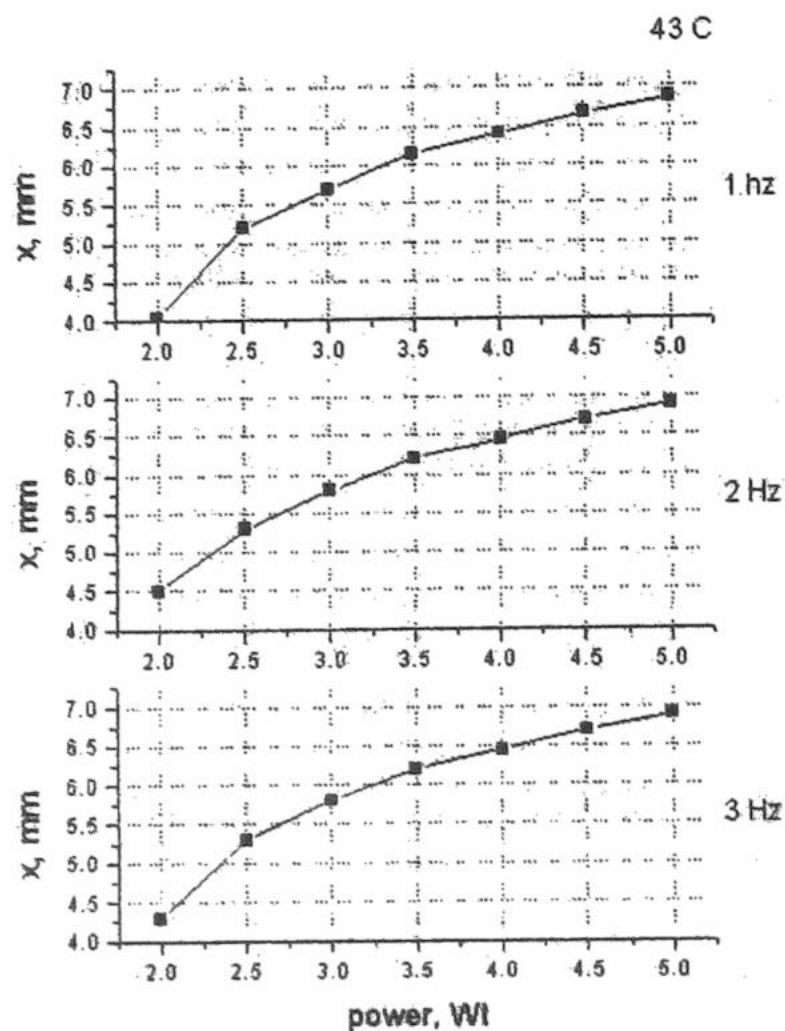


Рис.3 Залежність відстані від центру аплікатора ізотерми температури коагуляції 43°C від потужності лазера в режимах 1, 2 та 3 Гц.

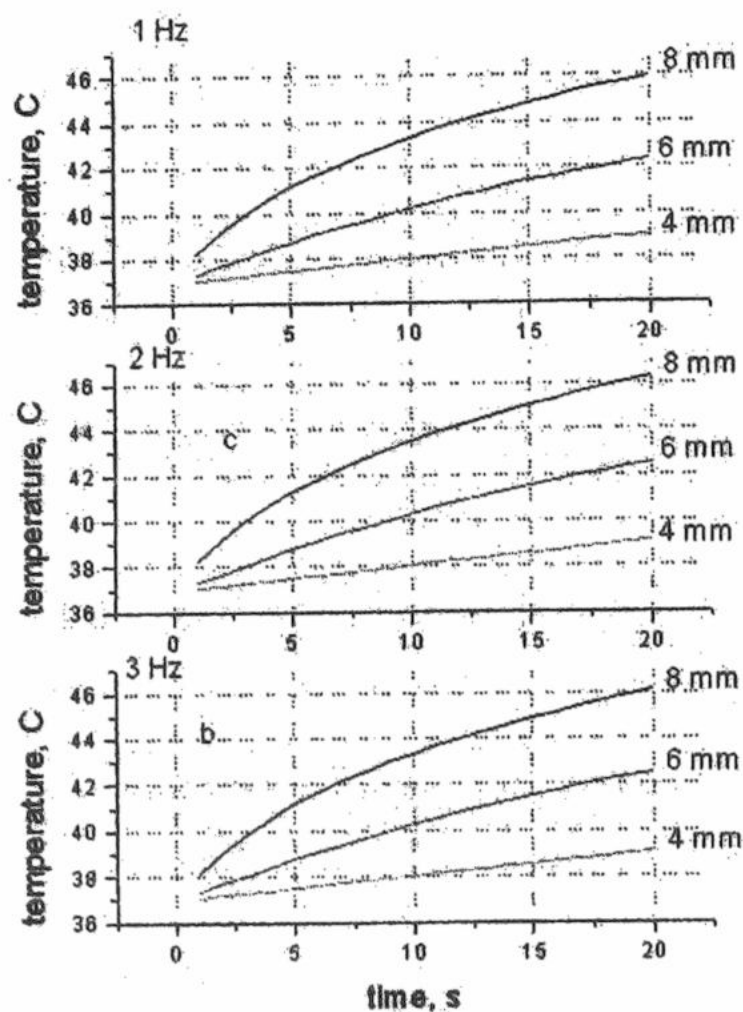


Рис.4 Часовий розподіл температури на відстанях 4, 6 та 8 мм від аплікатора в частотних режимах 1, 2 та 3 Гц.

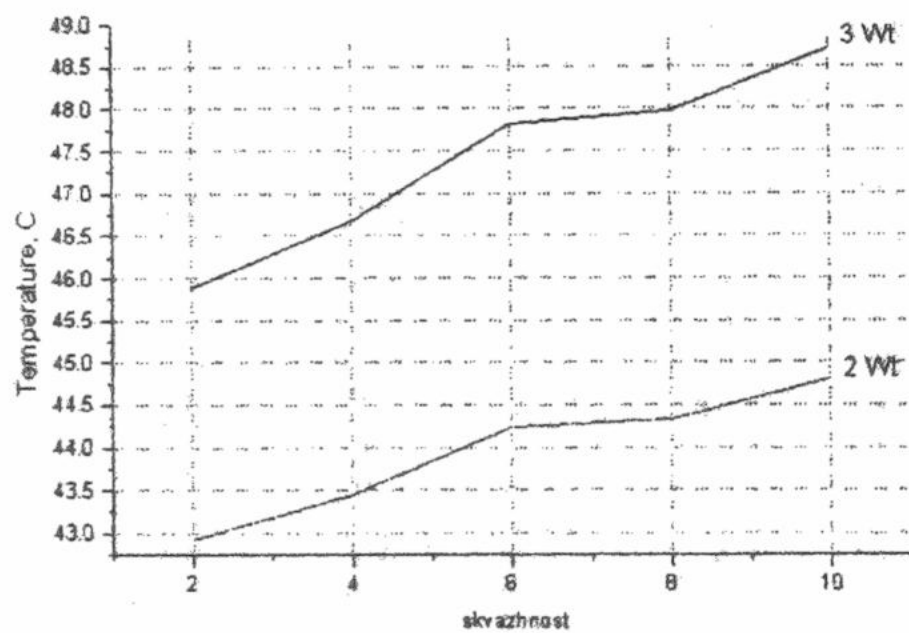


Рис 5. Залежність пікової температури прогріву тканин мозку від шпаруватості лазерного імпульсу при потужностях 2 та 3 Вт.

Таблиця 1

Тривалість імпульсу, с	потужність лазера, при якій спостерігається коагуляційна температура без розсіювача	потужність лазера, при якій спостерігається коагуляційна температура з розсіювачем
0.01	6	-
0.2	0.5	-
1	0.2	6

ВИСНОВКИ

Оскільки тканини мозку не є оптично прозорим середовищем, повна інтенсивність лазерного випромінювання на виході з аплікатора дорівнює сумі інтенсивностей лазерного променя і розсіяного світла. Тому для чисельного моделювання слід використовувати комбіновану модель, що складається з анізотропної та ізотропної компонент.

Можливість виникнення артефактів, різноманітність значень теплофізичних та оптичних параметрів біологічних тканин та точність їх вимірювання роблять доцільним використання для розв'язання рівнянь теплопровідності і дифузії випромінювання найпростіші стандартні різноцеві схеми з порядком апроксимації 2.

Числове моделювання лазерної термотерапії з врахуванням параметрів тканин мозку і виведення його результатів у вікно графічної оболонки дозволяє точно визначити розподіл температур в зоні впливу й наочно контролювати процес нагріву, пікові температури та розмір зони коагуляції, узгоджуючи таким чином параметри лазера – потужність, частоту й тривалість випромінювання.

Неперервне або імпульсне лазерне випромінювання є ефективним методом термотерапії в разі використання оптичного розсіювача. Цей метод дозволяє швидко (за 10-20 с) і безпечно (не сягаючи температур перегріву) за потужностей лазера від 2 до 5-6 Вт здійснити коагуляцію патологічних тканин в радіусі до 1 см.

ЛІТЕРАТУРА

1. Bown S.G.: Phototherapy of tumors. *World J. Surg.* 7 : 700-709 (1983)
2. Masters A, Bown S.: Interstitial laser hyperthermia in the treatment of tumors. *Lasers Med. Sci.* 5: 129-136 (1990)
3. P.W. Ascher, F. Ebner, R. Stollberger. MR-guided laser-assisted thermotherapy of cerebral BFMN tumors. In «Laser-induced Interstitial Thermotherapy» – SPIE Optical Engineering Press, USA, 1995, - p. 377-382.
4. Welch A.J., Wissler E.H., Prieb L. Significance of blood flow in calculation of temperature in laser irradiated tissue. *IEEE Trans Biomed Eng* 1980; BME-27: 164-165.
5. Горлов Н.В. Лекции по квантовой электронике. - М.: Наука, - 1988, 336с.
6. W.-F. Cheong, S.A. Prahl, A.J. Welsh, «A Review of the Optical Properties of Biologocal Tissue», *IEEE J. Quantum Electronics* 26, 2166-2185 (1990).
7. Roggan A., Dorschel K., Minet O., Wolff D., Muller G.: Optical properties of biological tissues. In «Laser-induced Interstitial Thermotherapy» – SPIE Optical Engineering Press, USA, 1995, - p. 10-45.
8. Ершов Ю.И., Шихов С.Б. Математические основы теории переноса. / Том 1. Основы теории. - М.: Энергоатомиздат, - 1985, 232 с.
9. Силин В.П. Введение в кинетическую теорию газов. - М.: Наука, - 1971, 332 с.
10. Зельдович Я.Б., Райзер Ю.П. Физика ударных волн и высокотемпературных гидродинамических явлений. - М.: Наука, - 1966, 686 с.
11. Самарский А.А Теория разностных схем. - М.: Наука, - 1989, 616 с.
12. Ильин В.П. Численные методы решения задач электрофизики. - М.: Наука, - 1985, 334 с.
13. Владимиров В.С. Уравнения математической физики. - М.: Наука, - 1976, 528 с.

УДК 577.35

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕДЛЕННОЙ КИНЕТИКИ ФОТОВОЗБУЖДЕНИЯ И РЕЛАКСАЦИИ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ БАКТЕРИЙ

Ю.М.Барабаш, Н.М.Березецкая, М.Т.Капустина, В.Н.Харкян

Институт физики НАН Украины, Киев, просп.Науки, 26, e-mail:kv@ukma.kiev.ua

Статья поступила в редакцию 20 апреля 2000 г.

Экспериментально исследовалось оптическое поглощение реакционных центров фотосинтетических бактерий при длительной фотоактивации и при активации импульсами по специальному протоколу. Процесс фотоиндуцированного переноса зарядов описывается теоретически с точки зрения взаиморегуляции потока фотоактивированных электронов и медленной структурной перестройки белкового комплекса макромолекулы. Проведено компьютерное моделирование экспериментальных результатов. Показано, что тривиальные процессы, типа возникновения дополнительных редокс-ловушек, способных длительное время удерживать электрон, не могут в достаточной степени объяснить полученные экспериментальные результаты.

Ключевые слова: реакционные центры Rb.sphaeroides, электронный транспорт, электрон-конформационное взаимодействие.

Реакционный центр фотосинтезирующих бактерий (РЦ) относится к числу наиболее известных и изученных биомолекулярных объектов. Он является основным элементом фотосинтетического аппарата, который осуществляет первичное разделение зарядов, инициирующее элементарный акт переноса протонов через фотосинтетическую мембрану. Многочисленные исследования позволили детально установить состав РЦ и описать кинетику переноса электрона между его редокс-кофакторами [1-3]. Эти исследования получили дальнейшее развитие после определения рентгеновскими методами структуры РЦ для различных типов фотосинтезирующих бактерий [4,5]. В настоящее время установлено, что реакционный центр - это сложная белковая мембрана, содержащая три субъединицы, L, M и H, и кофакторы: четыре бактериохлорофилла, два бактериофеофитина, два хинона и один высокоспиновый атом железа Fe^{2+} . После поглощения кванта света димер бактериохлорофилла переходит в возбужденное

состояние из которого, за времена порядка 10^{-7} -возможен перенос электрона по цепочке кофакторов на первичный хинонный акцептор Q_A , а затем за время $\sim 10^{-5}$ на финальный акцептор - убихинон Q_B (рис.1). За счет того, что скорости обратных переходов в РЦ на несколько порядков меньше чем прямых, квантовый выход первичной реакции фотосинтеза близок к единице. Установлено, что основным механизмом, обеспечивающим переход электрона между акцепторами является туннелирование [6,7].

Одним из наиболее интересных вопросов, не получивших пока удовлетворительного ответа, является вопрос о связи структурной (конформационной) динамики РЦ и его функционированием.

Ранее в наших работах [8-9] было высказано предположение, что пребывание электрона на каждом хинонном акцепторе может приводит к изменениям в структуре РЦ, которые могут накапливаться и сохраняться длительное время.

Конформационные изменения в свою очередь влияют на эффективность туннелирования электрона. Существование такой обратной связи приводит к нелинейным эффектам в процессе фотоактивации реакционного центра. Одним из наиболее ярких проявлений такой обратной связи может служить существенное (на несколько порядков) замедление скорости распада фотовозбужденного состояния

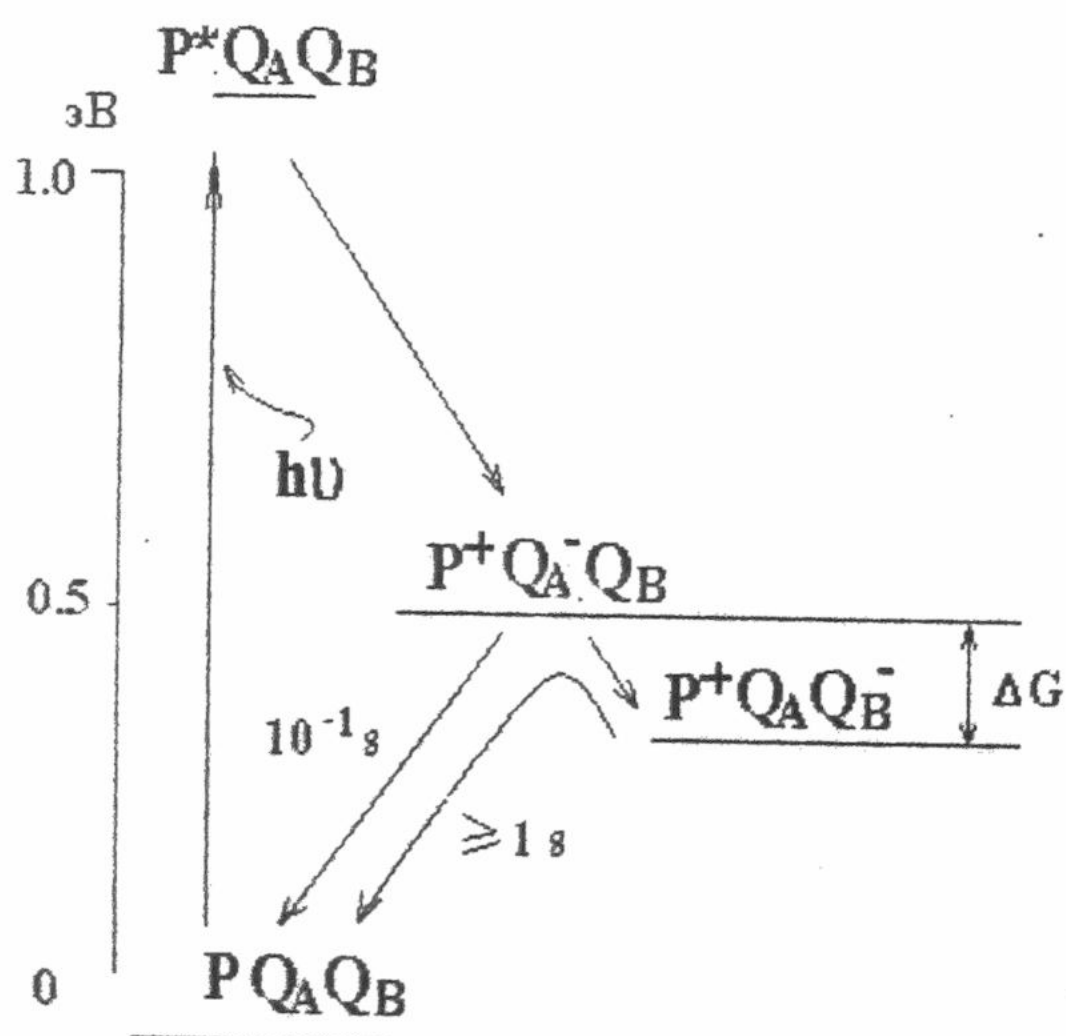


Рис.1 Упрощенная схема процесса фоторазделения и электронного переноса в фотосинтетических РЦ пурпурных бактерий. P - первичный донор; Q_A и Q_B - соответственно первичный и вторичный хинонные акцепторы.

Исследование медленной кинетики фотовозбуждения и релаксации ...

после прекращения длительной фотоактивации по сравнению с релаксацией этого же состояния после импульсного возбуждения.

В работах [8,9] была теоретически обоснована возможная роль медленных структурных перестроек РЦ в формировании "светового" конформационного состояния РЦ. Если частота элементарных процессов фотовозбуждения РЦ достигает определенного критического значения, возникшее "световое" конформационное состояние становится устойчивым т.к. структура РЦ после каждого элементарного акта рекомбинации не успевает релаксировать до наступления следующего акта фотовозбуждения.

Однако трактовка ряда полученных нами ранее экспериментальных результатов не может считаться однозначной и требует дополнительных исследований. Так, альтернативной возможностью для появления медленной компоненты релаксации коэффициента поглощения Q_B -активных РЦ в ответ на ступенчатое изменение интенсивности фотовозбуждения могут служить различного рода редокс-ловушки, не взаимодействующие с медленными структурными модами среды, но способные к захвату электрона на продолжительное время. Заметим, что подобные "жесткие" электронные ловушки, в отличие от "мягкой" редокс-ловушки на Q_B , не обладают памятью о пребывании электрона в фотовозбужденном состоянии после его рекомбинации на пигменте. Это обстоятельство позволяет провести исследование, направленное, в частности, на выяснение природы долгоживущих состояний фотоокисленного пигмента в условиях продолжительной световой активации.

В настоящей работе будет показано, что медленная кинетика фотовозбуждения и рекомбинации РЦ при различных условиях стационарного и импульсного фотовозбуждения находятся в хорошем количественном соответствии с результатами компьютерного моделирования, выполненного в соответствии с построенной нами ранее теорией саморегуляции электронного потока в макромолекуле. Отмечается ряд особенностей этой кинетики, которые не могут найти удовлетворительного в рамках представлений о "жестких" редокс-ловушках.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Известно, что уход фотовозбужденного электрона с димера бактериохлорофилла сопровождается характерными изменениями спектра поглощения РЦ, в частности, наиболее существенно "выцветает" полоса поглощения в области $\lambda=860-870$ нм. После возврата электрона на димер спектр полностью восстанавливается.

В настоящей работе методом оптической спектроскопии исследовалась кинетика изменения коэффициента поглощения при образовании фотоокисленного состояния пигмента под воздействием активирующего света разной длительности и кинетика распада этого состояния после выключения света. Характерные константы перехода электрона со вторичного хинонного акцептора на донор определялись с помощью аппроксимации несколькими экспонентами.

Процедура изоляции и приготовление образцов. Препараты РЦ были изолированы из бактерий *Rhodobacter sphaeroides* wild type по методике описанной ранее в работе [10]

Экспериментальная установка Программно-аппаратный комплекс (ПАК) предназначен для измерения оптического поглощения в растворах биологических веществ с фотопереносом заряда. Комплекс создан на базе ПК IBM со встроенной платой E-1050 системы сбора цифровой и аналоговой информации и позволяет измерять оптическое поглощение растворов в диапазоне величин $0 - 1 \pm 0,002$ на длине волны 865 ± 20 нм. В среднем поглощение исследуемых растворов составляло 0.2-0.3 для кюветы толщиной 1 см. Особенностью данного комплекса является использование тестирующего света низкой интенсивности ($0,3 \text{ мкВт/см}^2$) с частотой 5 КГц, и наличие дополнительного оптического канала для подсветки растворов. Она осуществляется на той же длине волны и может регулироваться в диапазоне интенсивностей от 0 до 5 мВт/см^2 (200 градаций) в линейной (или логарифмической) шкале в соответствии с программным обеспечением эксперимента. В качестве источника тестирующего света используется один светодиод, а для создания возбуждающего света используется набор из 4-х инфракрасных светодиодов с максимальной мощностью 50 мВт каждого.

Особенности реализации режимов облучения РЦ возбуждающим светом: 1. Режим облучения РЦ прямоугольными импульсами света различной длительности от 1 сек до 5000 сек. Максимальная интенсивность света I достигала 3 мВт/см^2 . Интенсивность света импульса регулировалась с шагом по 100 отн. ед. от 0 до 800 отн. ед. Интенсивность света контролировалась в течение всего времени экспозиции РЦ и корректировалась при необходимости. Шаг дискретизации измерения был переменным. Быстро идущие процессы (передний фронт нарастания сигнала и начальная фаза релаксации) измерялись с шагом 0.01 сек, далее шаг изменялся (0.1-1 сек) в зависимости от условий эксперимента и длительности записи.

2. Проведение измерений временных интервалов включения зондирующих импульсов возбуждающего света с фиксацией начального значения поглощения РЦ.

Определяли фоновое значение поглощения по 20-ти измерениям поглощения РЦ без фотоактивации. Подавали зондирующий импульс возбуждающего света (длительность, амплитуда импульса определялась параметрами эксперимента), и регистрировали изменение поглощения РЦ с шагом 0.1 с. После окончания импульса, когда вследствие релаксации фотовозбужденного состояния текущая величина поглощения РЦ приближалась к фоновому значению, начинали процедуру определения среднего значения поглощения РЦ по 20-ти отсчетам. В тот момент времени, когда измеренное среднее значение поглощения РЦ достигало фонового значения РЦ, происходило включение очередного зондирующего импульса. После прохождения 20-ти зондирующих импульсов РЦ выдерживались в темноте заданное время (500 с) и операция зондирования состояния РЦ повторялась. Таким образом были получены 10 последовательностей состоящие из 20-ти зондирующих импульсов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Нами была исследовано влияние длительности световой активации на образования долгоживущего состояния пигмента. На рис.2 представлена динамика коэффициента оптического поглощения в зависимости от длительности фотоактивации. Легко видеть, что увеличение времени экспозиции фотовозбуждения приводит к замедлению кинетики рекомбинации фотовозбужденных РЦ. Этот вывод непосредственно следует из результатов аппроксимации кривых рекомбинации с помощью четырёх экспонент. В таблице 1 приведены результаты такой аппроксимации.

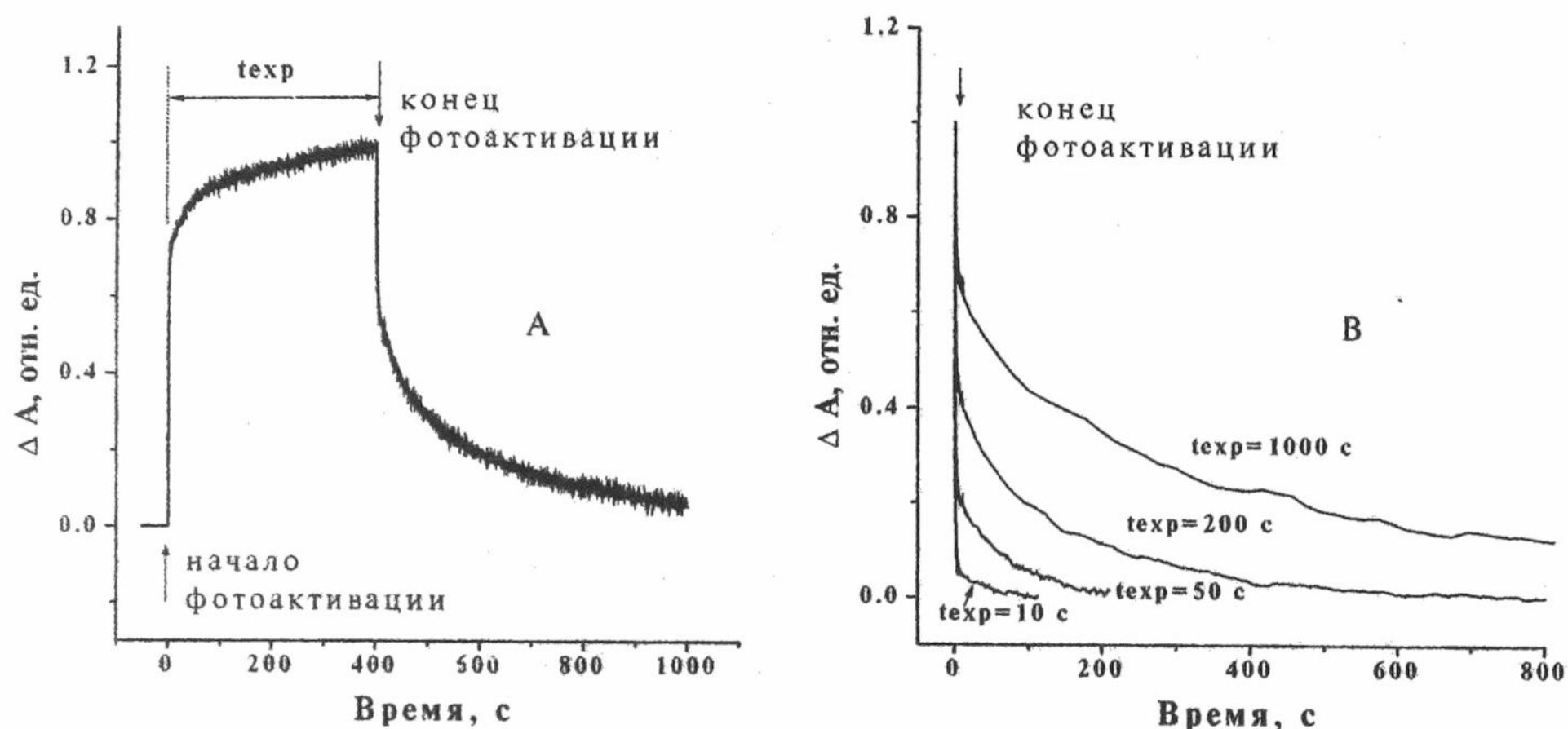


Рис.2 Зависимость изменения коэффициента оптического поглощения (значения нормализованы) от режима фотоактивации. (А) - полный протокол, t_{exp} указывает время фотоактивации. После окончания активации наблюдается распад возбужденного состояния $P^+Q_AQ_B^-$. (В) - кинетика темнового распада фотовозбужденного состояния в зависимости от длительности активации. $I=800$ отн.ед.

Таблица 1. Результаты аппроксимации экспериментально полученной кинетики темновой релаксации РЦ *Rb.sphaeroides* при различных временах фотоэкспозиции с помощью 4-х экспонент.

время экспозиции	1 значение экспоненты (сек)	1 вес экспон. %	2 значение экспоненты (сек)	2 вес экспон. %	3 значение экспоненты (сек)	3 вес экспон. %	4 значение экспоненты (сек)	4 вес экспон. %
$t_{exp}=1$ с	0.1	60	0.9	34	20	6		
$t_{exp}=10$ с	0.1	54	1.08	36	36	10		
$t_{exp}=50$ с	0.1	37	1.4	34	68	29		
$t_{exp}=200$ с	0.1	26	1.2	24	139	50		
$t_{exp}=1000$ с	0.1	12	1	19	215	54	1995	15

Учитывая, что скорость рекомбинации электрона с первичного акцептора на донор примерно равна 10с^{-1} , и что в образцах всегда присутствует доля таких РЦ, у которых электрон возвращается на донор с первичного акцептора не попадая на вторичный, мы фиксировали при обработке эту скорость, определяя только её весовой множитель. Из приведенной таблицы видно, что с ростом времени экспозиции от 1с до 1000с растет не только вес медленной компоненты рекомбинации с 6% до 70% ($54\%+15\%$), но и существенно уменьшается скорость медленной компоненты с 20с^{-1} до 1995с^{-1} .

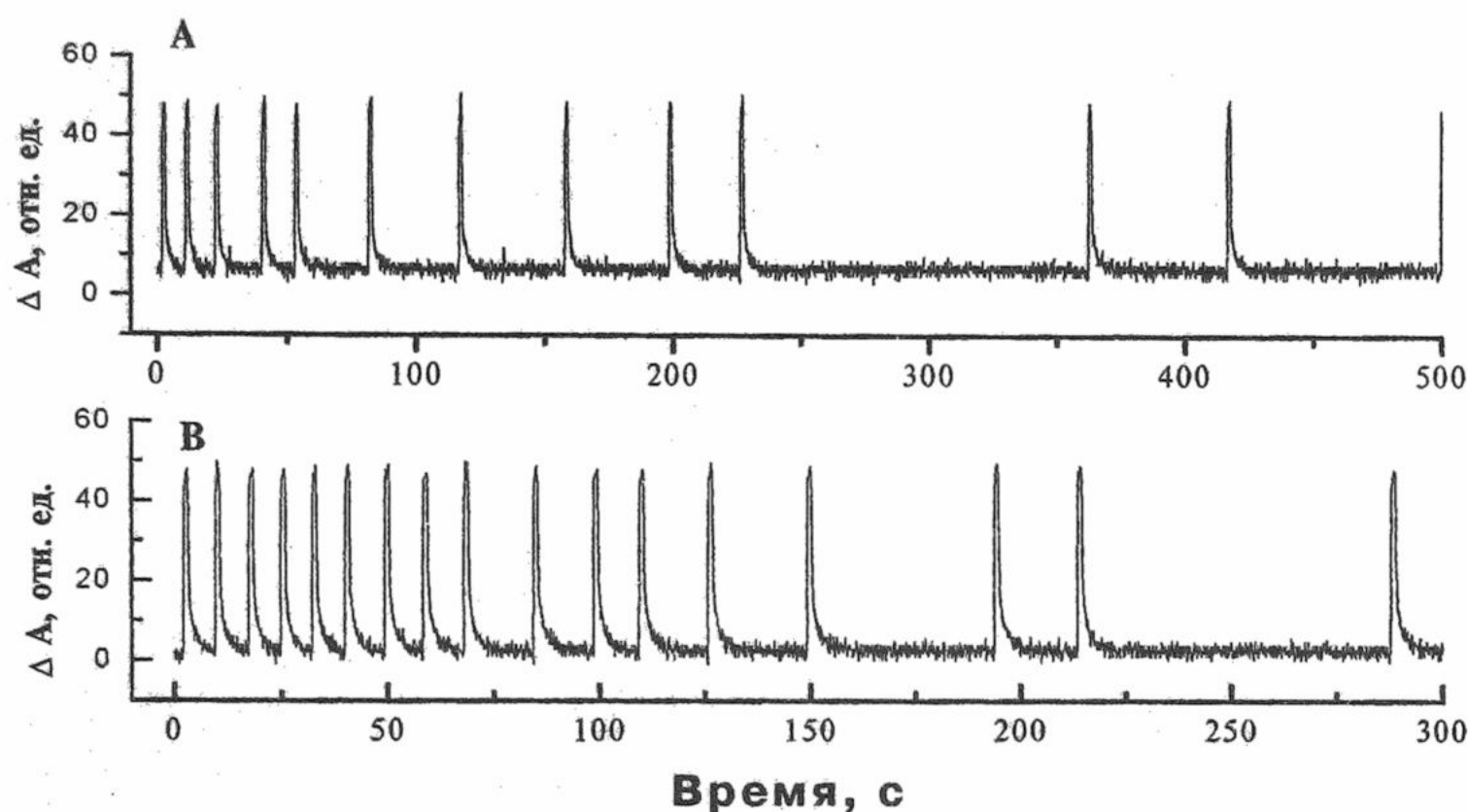


Рис. 3. Запись двух реализаций зондирования образцов РЦ последовательностью импульсов фотоактивации по специальному протоколу (см. МЕТОДЫ). $I = 800$ отн.ед.. Длительность импульса 1 с.

Для прямой проверки наличия структурной деформации РЦ, возникшей вследствие пребывания электрона на вторичном хинонном акцепторе Q_b нами была проведена серия экспериментов по специальному протоколу. Зондирование образцов РЦ проводилось последовательностью импульсов активации, причем каждый последующий импульс подавался автоматически после полного восстановления изменений линии поглощения, вызванных предыдущим импульсом. На рис.3 представлены различные варианты реализации данного эксперимента, которые свидетельствуют об увеличении интервалов между импульсами. Причиной этого, очевидно, является инициированное последовательностью импульсов накопление восстановленных РЦ в "световом" конформационном состоянии. Именно такие РЦ при импульсной активации дадут вклад в медленную кинетику рекомбинации.

Необходимо отметить, что количество таких РЦ будет незначительно, если они попадают в состояние PQ_B в результате процесса рекомбинации, который является значительно более медленным, чем переход структуры РЦ из "световой" в "темновую" конформацию.

Предложенный выше эксперимент предполагает накапливать малые порции восстановленных РЦ в "световом" состоянии от разных импульсов, фиксируя их количество по длительности интервалов между соседними импульсами. Таким образом, сам протокол эксперимента предполагает конкретную процедуру увеличения разрешающей способности эксперимента. Предполагается вместо измерения сигнала от малого числа РЦ в "световом" состоянии и с восстановленным пигментом, по весу медленной компоненты рекомбинации, фиксировать интервал между последовательным включением импульсов, что, как нетрудно показать, многократно увеличивает разрешающую способность эксперимента и позволяет зафиксировать наличие "памяти" о пребывании электрона в состоянии $P^+Q_B^-$. Однако предложенная процедура одновременно с значительным "усилением" сигнала приводит и к усилению его флуктуаций, что легко видеть из вида реализаций отдельных экспериментов. Поэтому нами была

проведена процедура усреднения результатов эксперимента с 20 импульсами по 10 реализациям, суть которой состояла в усреднении интервалов между k -тым и $k+1$ -ым импульсами для всех k от 1 до 19. Результаты этой процедуры для разных значений интенсивности фотовозбуждения представлены на рис.4. Нетрудно видеть, что несмотря на значительную дисперсию наблюдаемый эффект является статистически достоверным. Соответствующие значения коэффициентов корреляции приведены на том же рисунке.

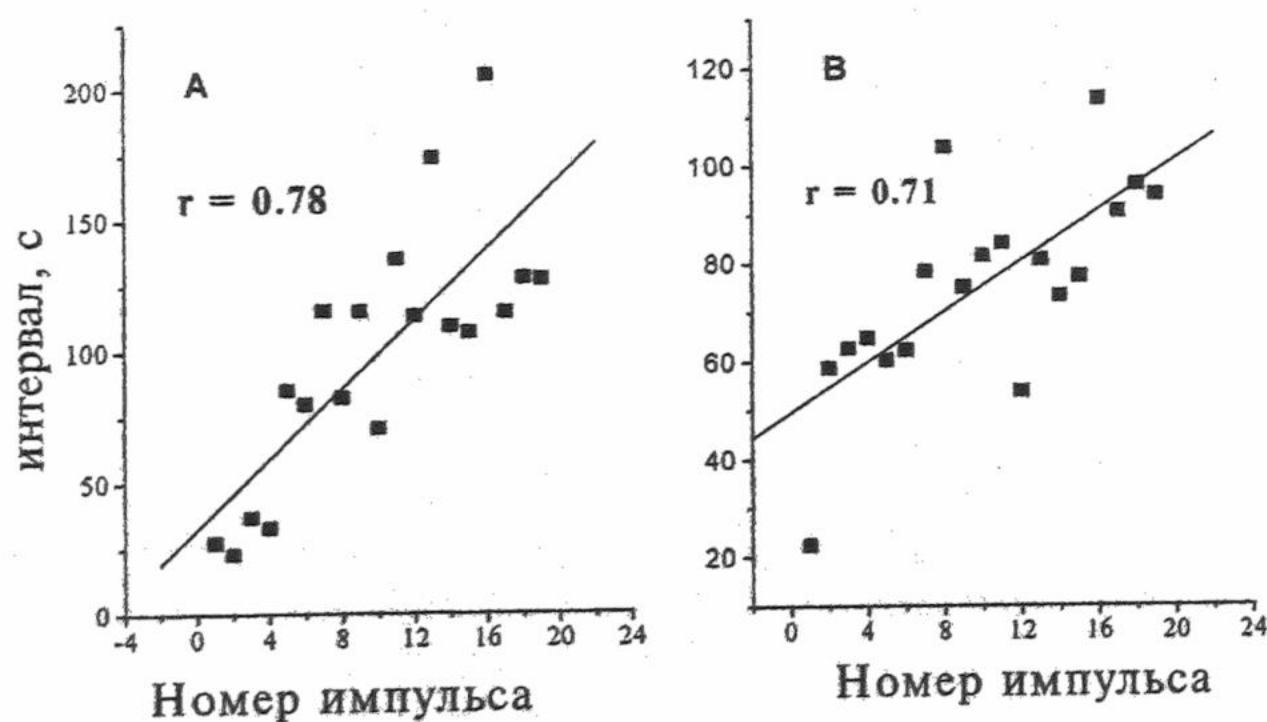


Рис.4 Зависимость длительности межимпульсного интервала от номера последовательно подаваемых импульсов. На рисунке представлен коэффициент корреляции r . А) $I = 400$ отн.ед.; В) - 800 отн.ед.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ И ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ.

В работах [1112] был предложен общий подход, позволяющий дать самосогласованное стохастическое описание электронных и конформационных перестроек РЦ в условиях действия постоянной световой активации. Предложенный подход основан на использовании представления об обобщенной структурной переменной – x , которая описывает коллективное движение различных групп, связанное с фотоиндуцированным перераспределением заряда в РЦ. В качестве такой переменной выбрана разность свободных энергий электрона на первичном и вторичном хинонных акцепторах, взятая в единицах $k_B T$ $x = \Delta G / k_B T$, см. рис.1. Предполагается, что локализация фотовозбужденного электрона на Q_B приводит к поляризации его окружения, что обуславливает понижение свободной энергии электрона на Q_B т.е. постепенный рост величины x от некоторого начального значения x_0 до максимального x . Очевидно максимальному значению x_b соответствует минимум потенциальной энергии $V_b(x)$ обобщенной структурной переменной x , при постоянной локализации фотовозбужденного электрона на Q_B . Развита нами количественная теория базируется на системе уравнений эволюции типа Фоккера–Планка для функции распределения- $P_n(t, x)$ дискретной электронной- ($n=p, b$) и непрерывной структурной- x , переменных.

На основе базовой системы уравнений эволюции в [11] была построена адиабатическая теория для многих элементарных актов переноса электрона, индуцированных постоянной световой активацией, при учете взаимодействия переносимого электрона со структурой РЦ. Адиабатическое приближение, в рамках которого электронные процессы в РЦ предполагаются быстрыми, а структурные перестройки медленными, позволило привлечь изящный формализм для описания поведения электрон-конформационной системы, основанный на использовании представления об эффективном конформационном потенциале, зависящем от интенсивности стационарного фотовозбуждения. Однако полученные экспериментальные результаты указывают на то, что при большой длительности фотовозбуждения скорость рекомбинации электрона замедляется настолько, что адиабатическое приближение нарушается, поэтому для количественного описания всей совокупности полученных экспериментальных результатов следует воспользоваться более общей базовой системой уравнений эволюции типа уравнений Фокера-Планка для двухуровневой системы в виде:

$$\begin{aligned} \frac{\partial P_P(t, x)}{\partial t} &= L_P P_P(t, x) - I P_P(t, x) + k_{AP} e^{-x} P_B(t, x) \\ \frac{\partial P_B(t, x)}{\partial t} &= L_B P_B(t, x) + I P_P(t, x) - K_{AB} e^{-x} P_B(t, x) \\ L_i &= D_i \frac{\partial}{\partial x} \left[\frac{1}{k_B T} \frac{\partial V_i(x)}{\partial x} + \frac{\partial}{\partial x} \right], \quad x = \frac{\Delta G_{AB}}{k_B T} \\ \frac{\partial V_i(x)}{\partial x} &= k_i (x - x_i), \quad i = P, B \end{aligned} \quad (1)$$

где I -интенсивность фотовозбуждения (в единицах, соответствующих в среднем одному фотовозбуждению РЦ в секунду) и k_{AP} -скорость рекомбинации электрона с Q_A на пигмент P , так, что скорость рекомбинации с Q_B есть $k_{AB} \exp(-x)$. Для простоты мы использовали здесь параболическую форму для обоих структурных потенциалов $V_P(x)$ и $V_B(x)$.

Уравнение (1) применимо для описания полной кинетики изменения поглощения образцами РЦ при импульсном фотовозбуждении, а также при включении и после выключения постоянного фотовозбуждения.

Для РЦ не содержащих Q_B мы будем ограничиваться балансной кинетикой для населенностей PQ_A и $P^+Q_A^-$ состояний и предполагать отсутствие структурной деформации т.е. изменений величины x . В таком случае кинетика изменения оптического поглощения РЦ:

$$\begin{aligned} \Delta A_{870}(t) &\equiv A_{870}(0) - A_{870}(t) \propto P_B(t), \quad \text{for RC with } Q_B; \\ &\propto P_A(t), \quad \text{for RC without } Q_B \end{aligned} \quad (2)$$

Исследование медленной кинетики фотовозбуждения и релаксации ...

В рамках рассматриваемой теоретической модели $P_B(t) = \int P_B(t, x) dx$, где величина $P_B(t, x)$ есть решение уравнения (1) для Q_B -содержащих образцов, а $P_A(t)$ - решение соответствующей системы балансных уравнений для РЦ не содержащих Q_B .

Кинетика роста и уменьшения числа РЦ с фотоокисленным пигментом качественно соответствует экспериментальной при различных значениях интенсивности и времени экспозиции фотовозбуждения. На рисунке 5 показано сопоставление результатов теоретического моделирования с экспериментальными данными при одном из возможных наборов параметров. Кривые состоят из возрастающей и спадающей веток, которые отвечают участкам фотовозбуждения и рекомбинации, соответственно. При этом возрастающая ветка содержит два существенно различающихся по кинетике участка: более быстрый, который соответствует, в основном чисто электронному фотовозбуждению и более медленный, кинетика которого определяется перестройкой структуры РЦ в новое стационарное состояние. В свою очередь спадающая ветка также содержит два различных по кинетике рекомбинации участка: первый, более быстрый, отвечает рекомбинации РЦ со структурной переменной x близкой к "темновому" стационарному состоянию x_P а второй, более медленный - рекомбинации РЦ с x более близким к x_B .

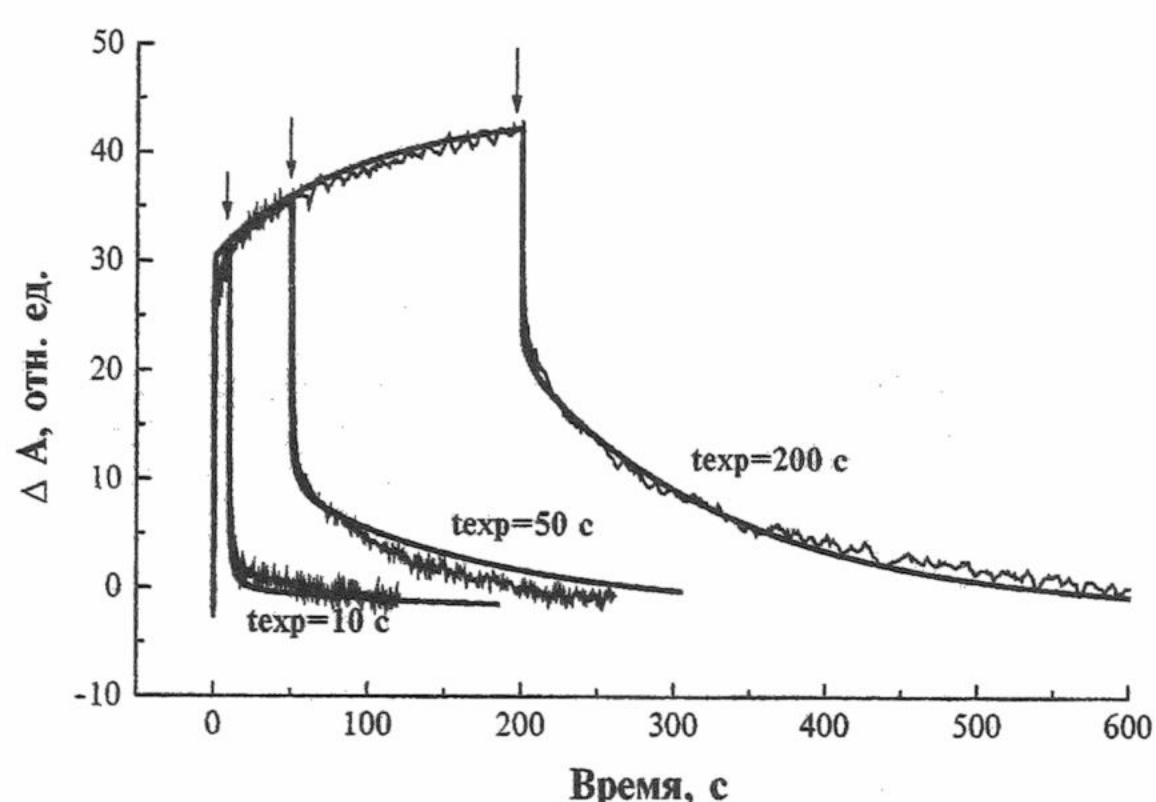


Рис.5 Результат аппроксимации трёх экспериментальных кривых путём численного решения системы диф.уравнений (1). Параметры модели были подобраны так, чтобы одновременно удовлетворять всем трем экспериментам. $x_P = 1$; $x_B = 8.7$; $k_P = 1$; $k_B = 0.1$; $D_P = 0.01$; $D_B = 0.02$, $I = 800$ отн.ед.

Из рисунка 5 видно, что при увеличении экспозиции фотовозбуждения происходит монотонный рост как величины, так и характерного времени медленной компоненты рекомбинации. Этот рост связан с тем, что при наличии фотовозбуждения происходит дрейф положения максимума функции распределения фотовозбуждённых РЦ $P_B(t, x)$ от стационарного значения x_P , которое соответствует максимуму функции распределения $P_P(t, x)$ (в момент включения света) по направлению к новому световому стационарному состоянию - x_B . После достижения максимумом функции распределения $P_B(t, x)$ величины x_B система выходит на насыщение.

Соответствие теоретических и экспериментальных результатов в процессе моделирования было улучшено за счет учёта ангармонических поправок к конформационному потенциалу

Следует отметить, что ряд особенностей рассмотренных выше экспериментов не может быть объяснен на основе представлений о жёстких редокс-ловушках. Так кинетика рекомбинации состояния $P^+Q_B^-$ при различных временах экспозиции показывает, что с ростом длительности экспозиции освещения образцов РЦ непрерывно растет не только доля, но и характерное время рекомбинации. Этот результат легко понять в рамках развиваемой авторами модели самоорганизации т.к. центр распределения фотовозбуждённых РЦ скользит по поверхности потенциала $V_b(x)$, в сторону увеличения x , и соответственно замедления времени релаксации. Наличие же "жёсткой" ловушки может привести лишь к росту вклада медленной компоненты рекомбинации, в то время как ее характерное время будет оставаться постоянным. Попытка сохранить концепцию "жёсткой" структуры РЦ потребует для объяснения последнего эксперимента предположить существование последовательности редокс-ловушек с постепенно увеличивающейся свободной энергией связывания электрона.

Использование зондирующих импульсов для обнаружения восстановленных РЦ в "световом" состоянии (рис.3а,б) свидетельствует, что с увеличением интервалов между соседними импульсами происходит уменьшение константы скорости рекомбинации $k_d(x) \equiv k_{AB}e^{-x}$. Этот вывод подтверждается и результатами компьютерного моделирования, которые представлены на рис.6. Легко видеть, что с увеличением номера зондирующего импульса рост количества РЦ, которые обладают медленной кинетикой рекомбинации, практически не происходит, но происходит значительное увеличение времени их рекомбинации. Это обусловлено ростом среднего по распределению $P_P(t, x)$ значения переменной x . Функция распределения $P_P(t, x)$ является решением второго из уравнений (1).

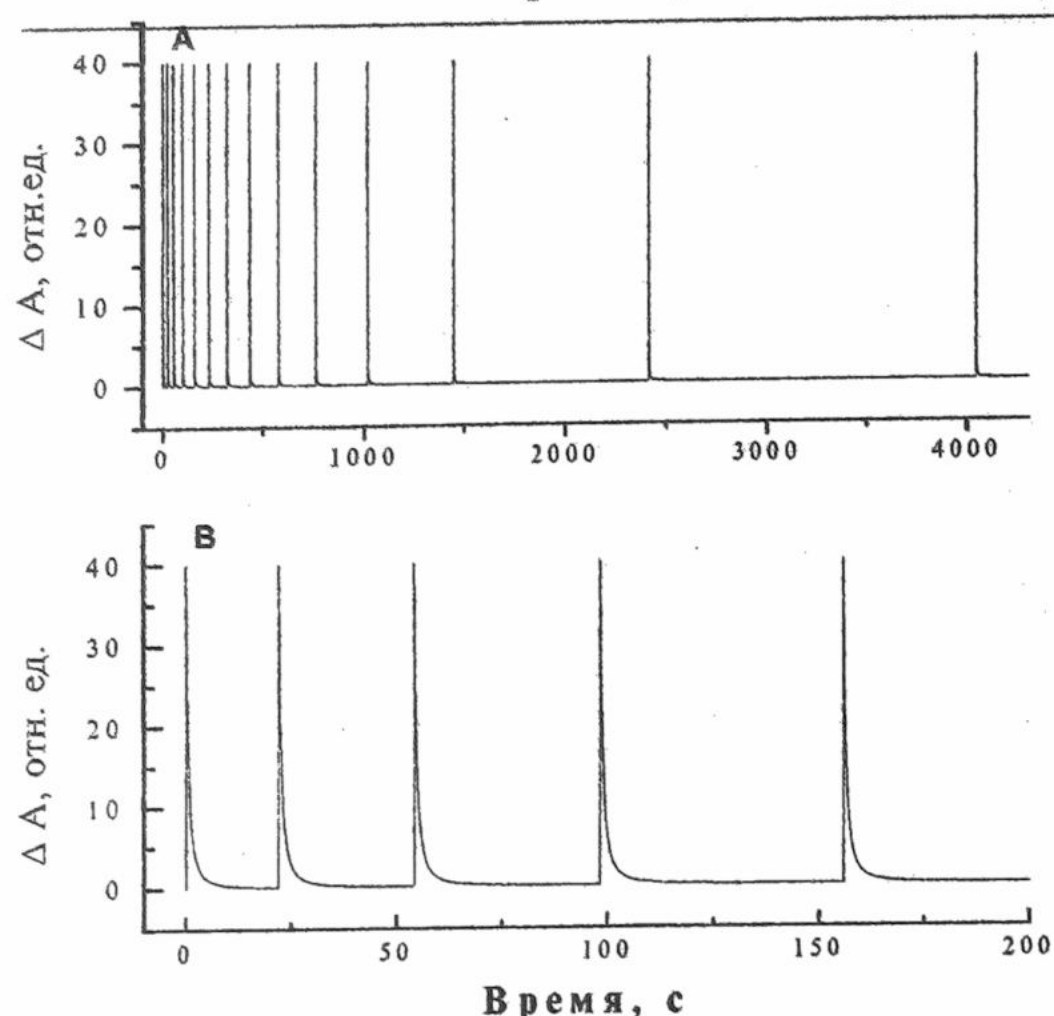


Рис.6 Результаты компьютерного моделирования экспериментов по фотоактивации серий импульсов. (В) - начальный участок последовательности на рис.(А.)

Это уравнение соответствует процессу рекомбинации электрона из состояния $P^+Q_B^-$ - в состояние PQ_B и связывает функции распределения $P_P(t, x)$ и $P_B(t, x)$

Необходимо отметить, что трудности экспериментального обнаружения (по кинетике изменения поглощения) восстановленных РЦ в "световом" конформационном состоянии связаны, в основном, со значительной крутизной темнового конформационного потенциала что приводит к быстрой структурной релаксации малого числа деформированных РЦ. Малое число РЦ в состоянии PQ_B с большим значением x объясняется тем, что константа рекомбинации

$k_d(x) \equiv k_{AB}e^{-x}$, которая определяет их

накопление, для этих центров достаточно мала.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что исследованные в работе особенности медленной кинетики фотовыцветания линии поглощения образцов РЦ *Rhodobacter sphaeroides wild type* на длине волны $\lambda=870$ нм. не могут быть объяснены исходя из представлений о "жестких" редокс-ловушках для фотовозбужденного электрона.

Таким образом медленная компонента кинетики фотовозбуждения и рекомбинации, по видимому, являются результатом взаимодействия фотовозбужденного электрона со структурными деформациями РЦ, которые накапливаются в результате последовательности элементарных актов фотовозбуждения. В результате чего скорость рекомбинации электрон-дырочной пары замедляется (уменьшается константа полунасыщения фотовозбуждения), что приводит к увеличению числа фотовозбужденных РЦ при фиксированной интенсивности действующего света. Этот процесс можно рассматривать как саморегуляцию электронного потока, за счёт его обратного действия, с помощью медленных структурных изменений РЦ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baltscheffsky, M., ed. 1990. Current research in photosynthesis. Vol. 1,2. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
2. Hoff, A.J. And Deisenhofer, J. 1997. Photophysics of photosynthesis. Structure and spectroscopy of reaction centers of purple bacteria. *Physics Reports – Review Section of Physics Letters*. 287:2-247.
3. Stowell, M.H.B.; McPhillips, T.M.; Rees, D.C.; Soltis, S.M., Abresch, E. and Feher, G. 1997. Light-induced structural changes and the mechanism of electron/proton transfer in the photosynthetic reaction center. *Science* 276:812-816.
4. Deisenhofer, J.; Epp, O.; Sinning, I. and Michel, H. 1995. Crystallographic refinement at 2.3-angstrom resolution and refined model of the photosynthetic reaction center from *Rhodospseudomonas viridis*. *J. Mol. Biol.* 246: 429-457.
5. Lancaster C.; Michel, H. 1996. Three-dimensional structures of photosynthetic reaction centers. *Photosyn. Res.* 48:65-74.
6. Шайтан К.В., Упоров И.В., Лукашев Е.Р., Кононенко О.А. А.Б.Рубин. 1991 Фотоконформационный переход - причина температурных и световых эффектов при рекомбинации электронов в реакционных центрах фотосинтезирующих бактерий Молекулярная биология, 25 695-705.
7. De Vault, P., Parkes, I.H. and Chance, B. 1967. Electron tunnelling in cytochromes. *Nature*, 215 642.
8. Goushcha (Goushcha), A.O., Dobrovolskii, A.A., Kapustina, M.T. Privalko, A.V. and Kharkyanen, V.N. 1994. New physical phenomenon of dynamic self-organization in molecular electron transfer systems. *Phys. Lett. A* 191:393-397.
9. Goushcha, A.O., Kapustina, M.T. and Kharkyanen, V.N. 1994 Nonlinear effect of dynamic self-organization in macromolecular systems caused by photocontrolled electron flux. *J. Biol. Physics* 19:273-283.
10. Muller, M.G.; Griebenow, K. and Holzwarth, A.R. 1992. Primary Processes in Isolated Bacterial Reaction Centers from *Rhodobacter Sphaeroides* Studied by Picosecond Fluorescence Kinetics; *Chem. Phys. Lett.* 199 465-469.
11. Goushcha, A. O., Kapoustina, M.T., Kharkyanen, V.N. and Holzwarth, A.R. 1997a. Nonlinear Dynamic Processes in an Ensemble of Photosynthetic Reaction Centers. Theory and Experiment., *J. Phys. Chem. B* 101:7612-7619.
12. Goushcha, A.O., Kharkyanen, V.N. and Holzwarth, A.R. 1997b. Nonlinear light-induced properties of photosynthetic reaction centers under low intensity irradiation., *J. Phys. Chem. B* 101:259-265.

УДК 615.47 517.9:574/578

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

СТАТИСТИЧНЕ МОДЕЛЮВАННЯ КОРЕЛЯЦІЙНИХ ЗАЛЕЖНОСТЕЙ ТЕКСТУРНИХ ПАРАМЕТРІВ УЛЬТРАЗВУКОВИХ ЗОБРАЖЕНЬ ПАРЕНХІМАТОЗНИХ ОРГАНІВ

М. К. Новоселець, С. П. Радченко

*Київський університет імені Тараса Шевченка, вул. Володимирська 64, Київ 01034, Україна,
nmk@mail.univ.kiev.ua, spr@mail.univ.kiev.ua*

14 ЧЕРВНЯ 2000 РОКУ

За допомогою математичного моделювання досліджується поведінка просторово розподіленої фізичної системи, що регулюється нелінійним зворотним зв'язком, як моделі паренхіматозного органу. На основі аналізу чисельних методів та ознак для побудови статистичних моделей розроблено практичний алгоритм моделювання розподілу статистичних параметрів паренхіматозного органу людини, в залежності від його стану. Проведено порівняння результатів теоретичних розрахунків з даними, що отримані під час експериментальних досліджень ультразвукових зображень щитовидної залози. Сформульовані практичні рекомендації щодо використання статистичних текстурних параметрів ультразвукових зображень в діагностичних цілях та висновки для вдосконалення моделі.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: просторово розподілена система, статистичний розподіл, текстура, ультразвукова інтроскопія, регуляція, паренхіма, щитовидна залоза.

Метою даної роботи є дослідження взаємозв'язку між статистичними параметрами текстури ультразвукових зображень паренхіматозних органів та особливостями його функціонування, що визначаються його зв'язками з іншими органами організму. Основою такого дослідження є уявлення про паренхіматозний орган як систему з розподіленими параметрами, що має зворотні зв'язки регулювання.

Оскільки будь-яка паренхіма є складовою системи органів та людського організму взагалі, біохімічні процеси, що відбуваються в ній, визначають фізіологічний стан її як органу, впливають на текстуру отриманих ультразвукових зображень. З іншого боку, вони визначають саморегуляцію системи, в яку включений даний орган.

Наприклад, щитовидна залоза складається із фолікулів парафолікулярної тканини. Фолікули заповнені напіврідким колоїдом, що має високу гормональну активність. В тканинах залози міститься йод, який входить до складу гормонів, які виробляються в фолікулах. В залозі синтезуються йодовані сполуки: монойодтирозин і дийодтирозин. Вони утворюють в клітинах комплексні сполуки з білком - тиреоглобуліном, які зберігаються в фолікулах. В результаті гідролізу цих сполук протеазою, яка виробляється клітинами щитовидної залози, вивільняються активні гормони: трийодтиронін та тетрайодтиронін, які надходять в кров і розносяться по тканинам організму. Нормальний або патологічний стан щитовидної залози визначається рівнем вироблення йодованих сполук, який керується, зокрема, нейрогормонами. Рівень вмісту йодованих сполук у фолікулах визначає фізичні властивості, що позначаються на взаємодії ультразвукового випромінювання [1] з тканинами щитової залози під час ультразвукової візуалізації і проявляються у вигляді текстури ультразвукових інтроскопічних зображень [2, 3]. Отримані ультразвукові зображення мають певну структуру, яка характеризує не окремий елемент, що приймає участь в метаболічному процесі, а весь ансамбль як ціле. До того ж, інтенсивність прийнятого ехо-сигналу безпосередньо не пов'язана з величиною вироблення гормонів [4, 5]. Тому можна говорити лише про загальні кореляційні залежності розподілів параметрів виробництва гормонів структурними елементами органа (залози) та статистичних текстурних параметрів ультразвукових інтроскопічних зображень паренхіми [6, 7].

Фізіологічні та біохімічні процеси регулювання в організмі людини спрямовані на підтримання стаціонарного нерівноважного стану метаболічної системи [8]. Попередній розгляд процесів регулювання дозволяє розділити всі ланцюги регулювання на дві взаємопов'язані складові, а саме: ті, які безпосередньо впливають на швидкість метаболічних процесів (зменшення або збільшення рівня вмісту відповідних гормонів, вироблення активаторів або інгібіторів відповідних процесів), та ті, які визначають самі енергетичні рівні цих метаболічних процесів (сон або активна м'язова діяльність, нормальний чи патологічний стани, тощо) [9]. Таким чином, ми маємо багаторівневу нерівноважну систему, в якій існують два механізми регулювання одночасно.

ПОСТАНОВКА ЗАДАЧІ, МОДЕЛЬ

Для моделювання зв'язку параметрів функціонування органу та параметрів текстури зображень використовувалась спрощена схема регуляції його стану, яка зображена на рис. 1.

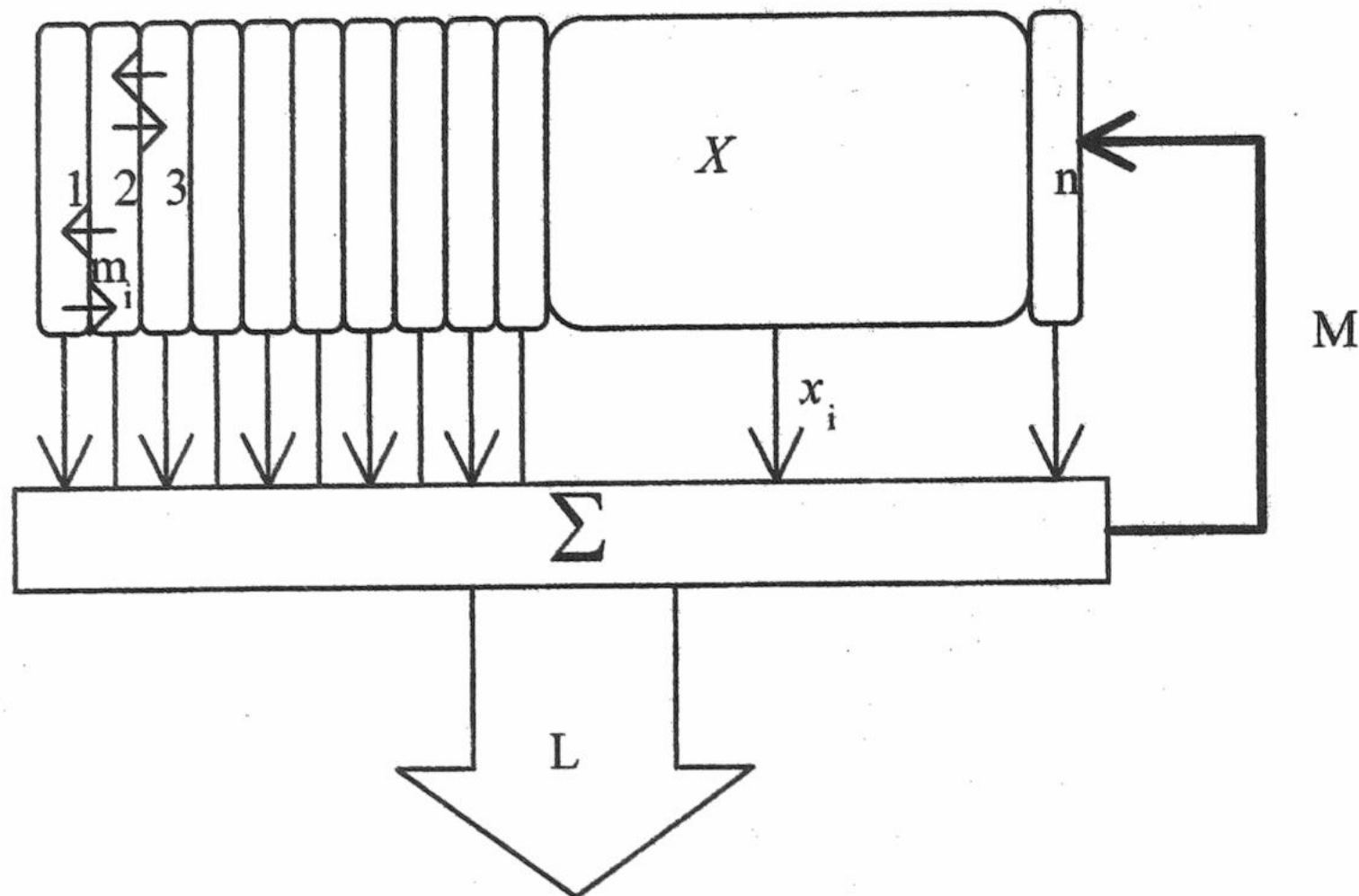


Рис. 1. Спрощена схема регуляції паренхіматозного органу.

Орган розглядається як розподілена система, що складається з N елементів, стан кожного з них визначається змінною x . Елементи зв'язані між собою, але в даній моделі враховується зв'язок лише сусідніх елементів введенням потоків m . Вважається, що стан x пропорційний виробленню певної речовини. Сумарна кількість цієї речовини L одночасно визначає зворотній регулюючий зв'язок, що моделюється ланцюгом M . Сигнал зворотного зв'язку розпаралелюється з певними ваговими коефіцієнтами по елементах органу.

Загальний аналіз такої моделі регулювання показує можливість наростання статистичної неоднорідності змінних x в процесі підтримання сумарної функції органу за рахунок зворотного зв'язку при збуреннях параметрів моделі.

Система диференціальних рівнянь, що описує модель, має такий вигляд:

$$\begin{cases} \frac{dx_i}{dt} = M(\alpha_i(y - y_0)^3 + \beta_i(y - y_0)) - l_i x_i + m_i(x_{i-1} - 2x_i + x_{i+1}) \\ \frac{dy}{dt} = \sum_{j=1}^N A_j x_j - ky \end{cases} \quad 1$$

Де x_i - виробництво основної речовини; M - коефіцієнт зворотного зв'язку; l_i - коефіцієнт швидкості розпаду основної речовини; A_i - ваговий множник; k - коефіцієнт швидкості розпаду речовини регулятора; α_i та β_i - коефіцієнти ефективності регуляції; y - концентрація речовини регулятора; y_0 - початкове значення концентрації речовини-регулятора; m_i - коефіцієнт впливу сусідів ($i = 1 \div N$).

Дана модель дозволяє розглядати еволюцію статистичних параметрів ансамблю X при випадкових змінах параметрів (що виводять систему з стану рівноваги).

Моделювалися стани, до яких еволюціонує регулююча система, при різних умовах її функціонування. Елементи системи мають лінійний розподіл, вплив лише найближчих сусідів вважався лінійним. Для дослідження поведінки системи було використано модель на основі диференціальних рівнянь з функцією регулювання, що апроксимувалася кубічною нелінійністю.

Чисельне розв'язання вказаної системи рівнянь відшукувалося за допомогою метода Ейлера та схеми керування величиною кроку Рунге-Кути-Мерсона для збільшення точності розв'язків [10]. Початкові параметри системи мали нормальний розподіл та генерувалися за допомогою вказування середнього значення та дисперсії. Розв'язуючи систему рівнянь програма розраховує новий стан регулюючої системи в наступний момент часу t у вигляді вектору $\{x, y\}$ ($x = \{x_1, x_2, \dots, x_i, \dots, x_N\}$),

Статистичне моделювання кореляційних залежностей текстурних параметрів ...

за значеннями якого обчислювали статистичні показники $\bar{x}$, σ . Для отримання функції густини імовірності розподілу x експеримент повторювали K разів та фіксували масив середніх значень та дисперсії, що характеризують встановлений стан щитовидної залози. Діапазон значень x_i було рівномірно розділено на 10000 рівних відрізків для дискретизації значень і накопиченням отримано гістограму $N(x_i)$. За накопиченим масивом даних розраховували функцію густини імовірності - $P(x) = \Pr\{F(i, j) = x\} \approx N(x_i)/N$ та $P(x_1, x_2) = \Pr\{F(i, j) = x_1, F(m, n) = x_2\}$, що дозволило встановити значення параметрів розподілу x_i : середнє $\bar{x}$, дисперсію σ , коефіцієнт асиметрії b_s , коефіцієнт ексцесу b_e , енергію E , ентропію H , момент інерції M_i [11, 12] та знайти їх кореляційну функцію.

Для розрахунків обмежилися кількістю елементів $N = 100$ та кількістю накопичень $K = 50$. Подальше збільшення кожного з параметрів окремо, чи обох одночасно не призводило до статистично значимих змін в результатах обчислень. Початкове значення рівня виробництва гормону i -им елементом, значення кожного із коефіцієнтів: зворотного зв'язку, швидкості розпаду основної речовини, впливу сусідів, швидкості розпаду речовини регулятора, ефективності регуляції; вагові множники; і початкове значення концентрації речовини-регулятора отримували із випадкової вибірки, що генерувалася виходячи із середнього значення відповідної величини та її дисперсії за нормальним розподілом. Очевидно, що саме сукупність значень вказаного набору параметрів однозначно характеризує положення даної системи.

Моделльне подання 1 відображає лише макро процеси і мало придатне для вивчення динаміки. Але саме стаціонарні стани системи без урахування еволюційного шляху наближення до них і є найбільш цікавими для аналізу текстур органів. Обчислення зупиняли в момент часу t , коли зміна стану системи (сума відносних змін значень параметрів на наступному кроці ітерації в часі) не перевищувала наперед задану точність δ .

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

Система 1 є абсолютно стійкою. З плином часу t встановлюється такий стаціонарний стан системи, при якому $\bar{x}$ стає. $\bar{x}$ та σ_x в стаціонарному стані не залежить від початкових $\bar{x}$, σ_x та визначається значеннями коефіцієнтів M , l , A , k , α та β , y_0 та m . Така залежність $\bar{x}$ в стаціонарному стані виключно від значень коефіцієнтів системи як раз і означає, що саме вони однозначно описують її стан. На рис. 2 зображено хід еволюції системи від різних початкових значень $\bar{x}$ та σ_x .

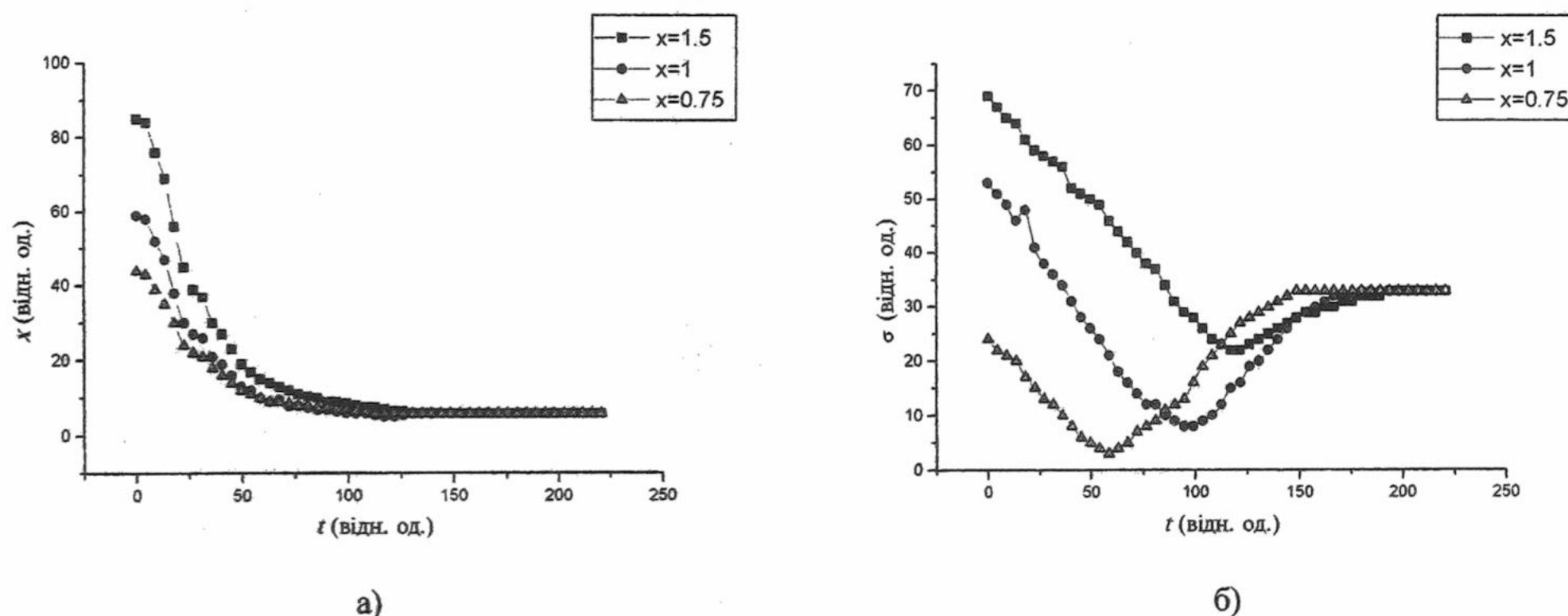


Рис. 2. Еволюція системи в часі: а) $\bar{x}(t)$, б) $\sigma_x(t)$.

На зміну значення $\bar{x}$ найбільш впливає y_0 , значення якого і є результатом роботи другого механізму регуляції. Саме рівень y_0 та зв'язана з ним $\bar{x}$ безпосередньо пов'язані з нормальним чи патологічним станом органу, наприклад, щитовидної залози. Стає очевидним, що дослідження механізмів впливу на величину y_0 - моделювання другого механізму регулювання може привести до пояснення причин відхилення стану щитовидної залози від нормального. На рис. 3 зображено зміну значень статистичних характеристик в залежності від зміни рівня y_0 .

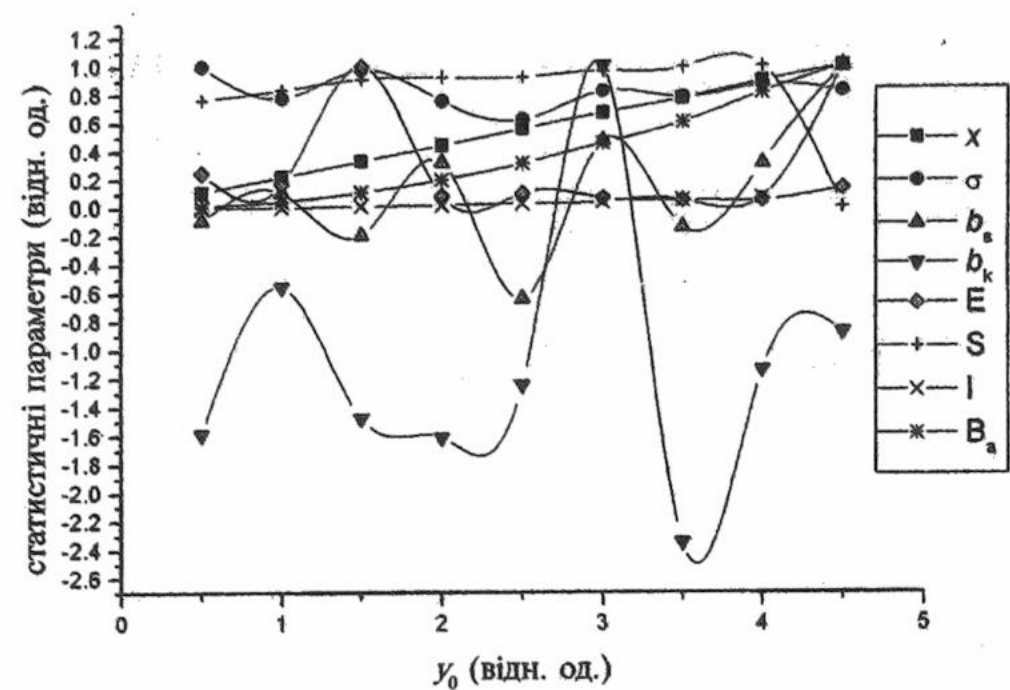


Рис. 3. Залежність статистичного розподілу від рівня y_0 ($N = 100$, $\bar{x}(t = 0) = 1$, $\sigma_x(t = 0) = 0.1$, $M\bar{\alpha} = 0.7$, $\sigma_{\alpha} = 0.2$, $M\bar{\beta} = -0.2$, $\sigma_{\beta} = 0.2$, $\bar{A} = 0.005$, $\sigma_A = 0.2$, $\bar{l} = 0.05$, $\sigma_l = 0.3$, $k = 0.1$, $m = 0.3$).

Розраховані теоретичні залежності співставлені із результатами обробки текстури ультразвукових зображень щитовидної залози пацієнтів із різними діагнозами стану вказаного органу. При цьому вважалось, що УЗ сигнал від відповідних елементів зображення лінійно зв'язаний з станом елемента x . Виявлені теоретично кореляційні залежності між парами статистичних параметрів співпадають з відповідними залежностями між статистичним текстурними характеристиками ультразвукових зображень паренхіми щитовидної залози. Результати порівняння подано в таблиці 1.

Коефіцієнт кореляції	$\bar{x} - \sigma_x$	$B_a - B_g$
теоретичний результат	0.996	0.99
експериментальні дані	0.944	0.99

Табл. 1. Значення коефіцієнта кореляції для пар статистичних параметрів.

Для випадків гіперфункції та гіпофункції паренхіматозного органу проведено якісний аналіз виду функціональних залежностей $\bar{x} = F(\sigma_x)$ та $B_a = F(B_g)$, де $F(\cdot)$ - лінійна функція. Якісний характер такого аналізу полягав в довільності кількісного вибору рівнів y_0 ($y_0^{\text{гіпофункція}} \ll y_0^{\text{норма}} \ll y_0^{\text{гіперфункція}}$) для випадків нормального функціонування, надвиробництва та недовиробництва гормону паренхімою. Результати теоретичного моделювання випадків нормального функціонування, надвиробництва та недовиробництва гормону паренхіматозного органу та кількісні характеристики для щитовидної залози пацієнтів із діагнозами норма, гіпотиреоз та тиреотоксикоз наведені на рис. 4.

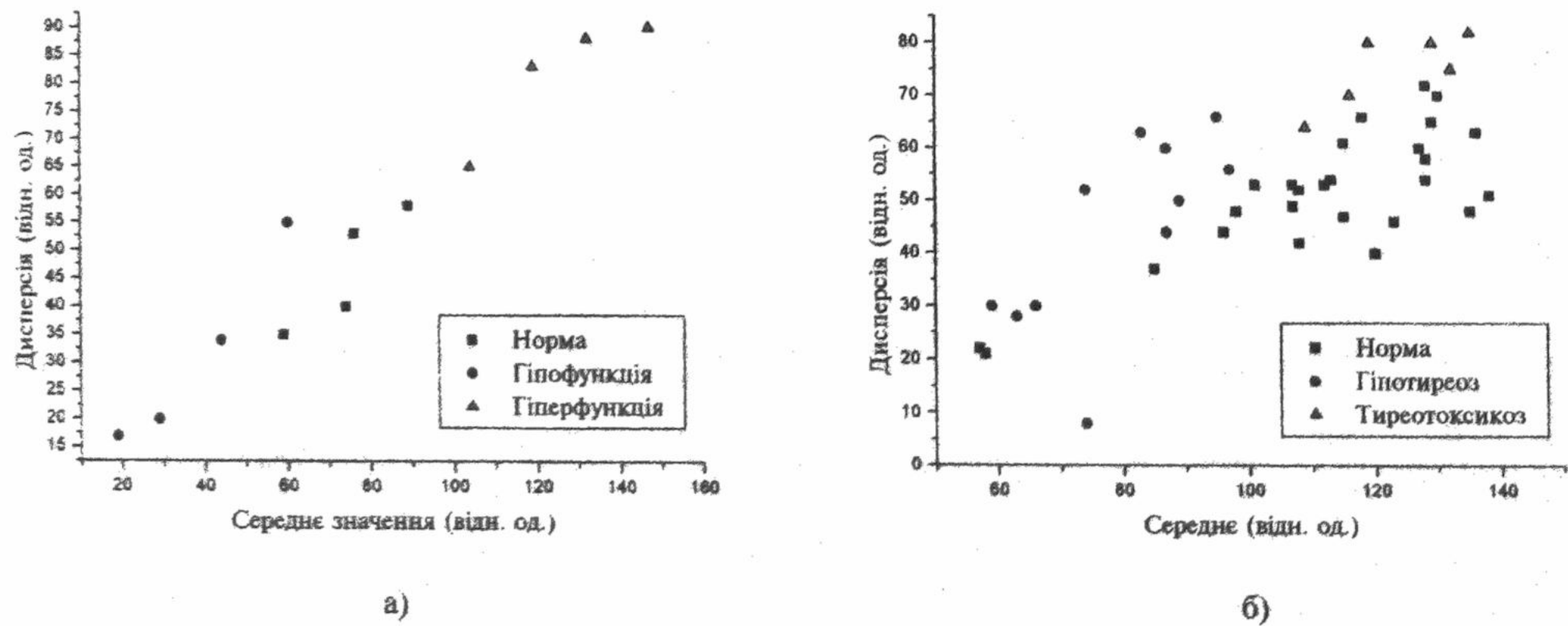


Рис. 4. Залежність σ_x від $\bar{x}$ для випадків нормального функціонування, надвиробництва та недовиробництва гормону щитовидною залозою. а) теоретична залежність, б) експериментальні дані.

Статистичне моделювання кореляційних залежностей текстурних параметрів ...

Краще просторове розділення теоретичних точок для випадків нормального функціонування, надвиробництва та недовиробництва гормону щитовидною залозою в просторі $\bar{X}, \sigma_x$ можна пояснити не повною відповідністю моделі реальним умовам ("рафіноване" подання реальної ситуації). Відхилення в роботі щитовидної залози від нормального стану функціонування пов'язане не лише із зміною рівня виробництва гормону. Тобто, можна стверджувати що збільшення або зменшення рівня вироблення гормону є відповіддю на зміни стану, що відбуваються під дією багатьох факторів. Зміна стану є сукупна зміна значень всього набору параметрів, а не лише рівня y_0 . Коректне подання зміни значень цього набору параметрів для теоретичних розрахунків не можливе без врахування другого механізму регуляції. Таким чином, модельна система 1 добре описує поведінку паренхіматозного органу лише в рамках одного стану. Зміни самого стану та перехідні явища, що при цьому виникають, вимагають додаткового удосконалення моделі, а саме - внесення залежності параметрів системи від рівня системи та додання другого механізму регулювання. Іншими словами це можна висловити як те, що модель 1 є внутрішня ланка більш загальної і складнішої моделі поведінки паренхіматозного органу.

ВИСНОВКИ

Чисельне моделювання текстури паренхіматозного органу, як фізичної системи з розподіленими параметрами, що має нелінійний зворотній зв'язок регулювання показало, що статистичні параметри її текстури визначаються параметрами системи регулювання. Отже, порушення в цій системі можна виявити в результаті класифікації параметрів текстури.

Виявлено корелювання значень деяких статистичних параметрів та існування подібної кореляції між відповідними статистичними текстурними числовими характеристиками експериментальних ультразвукових діагностичних зображень щитовидної залози. Це підтверджує ідею, що саме розподіл параметрів системи корелює із станом органу. Збільшення або зменшення інтенсивності ехо-сигналу прямо не пов'язане із рівнем вироблення гормону тканинами. Але поряд з цим спостерігається помітна кореляція значення статистичних параметрів розподілу структурних елементів паренхіматозного органу та числових текстурних параметрів отриманих ультразвукових інтроскопічних зображень. Тому саме значення функціональної залежності між статистичними текстурними параметрами інтроскопічних зображень можуть бути обрані за фізичних характеристик біологічних тканин, які пов'язані з характером їх функціонування.

Таким чином, проведені дослідження теоретично обґрунтовують вибір множини ознак, що використовуються для автоматизованої діагностики стану паренхіматозних органів.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Узбб С. Физика визуализации изображений в медицине, Мир, Москва 1991, 408 с.
2. Гридко А. М., Новоселец М. К., Радченко С. П., Цубин В. А. Методические рекомендации по ультразвуковой диагностике заболеваний щитовидной железы с использованием компьютерной обработки видеоизображений, Министерство Здравоохранения Украины, Научный Центр Радиационной Медицины АМН Украины, Киев-1995, (Утверждено 17.04.1995 зам. министра здравоохранения Украины Пономаренко В.М.).
3. Михайло Новоселець, Сергій Радченко, Віталій Цубін, Дослідження характеристик зображень щитовидної залози з метою діагностики її стану, "УкрОбраз" - Друга Всеукраїнська міжнародна конференція, Україна, Київ, 20-24 грудня 1994 року, с.260-263.
4. Эпштейн Е. В., Олейник В. А., Тронько М. Д., Имшинецкий П. В. Ультразвуковая диагностика заболеваний эндокринных желез, Здоровье, Киев, 1992 92 с.
5. Chung-Ming Wu, Yung-Chang Chen Texture Features for Classification of Ultrasonic Liver Images, IEEE Trans. on Medical Imaging, vol.11, № 2, 1992, p.141-152.
6. Гридько О. М., Новоселець М. К., Радченко С. П., Романенко А. Ю. Спосіб оцінки стану паренхіматозних органів, Рішення про видачу патенту на винахід від 21.07.1998, реєстраційний номер заявки 97073715.
7. Novoselets M. K., Radchenko S. P., Tsubin V. A., Gridko O. M. Ultrasound introsopic image quantitative characteristics for medical diagnostics and refinements of physical noise rise riasons. SPIE Medical Imaging, Newport Beach, 1994, USA 2163-45.
8. Косицкий Г. И. Физиология человека, Медицина, Москва, 1985, 544 с.
9. Стерка П. Основы физиологии, Мир, Москва, 1984, 556 с.
10. Иванов В. В. Методы вычислений на ЭВМ. Справочное пособие, Наукова думка, Киев, 1986, 584с.
11. Прэтт У. Цифровая обработка изображений, Том 2, Мир, Москва, 1982, 480с.
12. Haralick R. M., Shanmugan K., Dinstein I., Texture Features for Image Classification. IEEE Trans. Systems, Man, and Cybernetics, 1973, 610-621.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК 577.3

ЗАВИСИМОСТЬ ГИДРАТАЦИИ ФИБРИНОГЕНА ОТ ДОЗЫ γ -ОБЛУЧЕНИЯ ПО ДАННЫМ СВЧ-ДИЭЛЕКТРОМЕТРИИ

О.А. Горобченко, О.Т. Николов, В.П. Берест, С.В. Гаташ

*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, 61077, Харьков, пл. Свободы, 4, Украина;
e-mail: @univer.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 24 марта 2000 г.

Исследовано влияния γ -облучения на структурные изменения молекулы фибриногена методом СВЧ-диэлектromетрии на частоте 9,2 ГГц. Получены зависимости диэлектрической проницаемости водных растворов фибриногена от концентрации и дозы облучения в области доз 5 – 200 Гр. Вычислена степень гидратации белка. Структурные перестройки молекулы фибриногена, сопровождающиеся изменением гидратации, отмечены при облучении дозами 10–15, 35, 50, 100, 140–150 Гр.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фибриноген, γ -облучение, гидратация, структурные изменения, СВЧ-диэлектromетрия.

Лабильные продукты, получаемые из плазмы крови, подвергают действию ионизирующего излучения в дозе 5000 рад [1]. Облучение в дозах до 75 Гр не приводит к стерилизации хранившихся образцов [2]. Показана возможность облучения в больших дозах без потери функциональной активности [3]. По результатам одно- и двумерного электрофореза в натрия додецилсульфат полиакриламидном геле белки тромбоцитов не расщепляются и не образуют сшивок при γ -облучении дозой 5000 рад [4]. В работах [5] и [6] отмечены структурные изменения в молекуле фибриногена при γ -облучении в водных растворах. Однако состояние гидратного окружения молекулы белка при действии ионизирующего излучения остается невыясненным, хотя многими исследователями отмечается ведущая роль гидратации в стабилизации конформации фибриногена и ее влияние на поверхностно-зависимые взаимодействия [7]. В данной работе методом СВЧ-диэлектromетрии на частоте 9,2 ГГц исследовано изменение гидратации фибриногена при γ -облучении дозами до 200 Гр. В этом диапазоне изменение комплексной диэлектрической проницаемости связано с изменением количества свободной воды в системе белок-вода. Радиационное воздействие, вызывающее нарушения в молекуле фибриногена, влияет на характер взаимодействия макромолекулы с растворителем. Изменение количества связанной белком воды является следствием структурных переходов в молекуле.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Фибриноген выделяли из плазмы крови человека экстракцией спиртом [8]. Растворы фибриногена в воде концентрации 1–5 мг/мл облучали дозами от 5 до 200 Гр источником ^{60}Co на установке типа "Исследователь". Мощность экспозиционной дозы составляла 400 Р/мин.

Измерение действительной ϵ' и мнимой ϵ'' частей КДП образцов проводилось на СВЧ-диэлектromетре резонаторного типа на частоте 9,2 ГГц [9] при 15–20 °С. Значения ϵ' и ϵ'' находили по градуировочным кривым, полученным для водно-ацетоновых смесей по данным работы [10]. В величину ϵ'' была внесена поправка в связи с присутствием в растворе неорганических ионов. Для этого измерялась низкочастотная проводимость σ мостом переменного тока Р 586 на частоте 1000 Гц.

Степень гидратации фибриногена $\omega = \Gamma_{\text{воды}}/\Gamma_{\text{белка}}$ определяли, используя значения ϵ' , ϵ'' и σ [11]. Значения высокочастотной диэлектрической проницаемости $\epsilon_{\infty \text{ воды}}$ и $\epsilon_{\infty \text{ белка}}$ приняли равными 2,5 и 5,6 соответственно [12]. Парциальный удельный объем фибриногена $v=0,706 \text{ см}^3/\text{г}$ [13]. Считали, что молекула фибриногена имеет форму эллипсоида с соотношением осей 1:20 [14].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе исследованы зависимости $\Delta\epsilon'$ от концентрации нативного фибриногена (контроль) и, облученного дозами 10, 50, 100, 150 и 200 Гр. Величина $\Delta\epsilon'$ определяется как уменьшение ϵ' раствора белка по сравнению с водой, т.е. $\Delta\epsilon' = \epsilon'_{\text{воды}} - \epsilon'_{\text{белка}}$. В пределах погрешности зависимость ϵ' от концентрации для нативного фибриногена имеет линейный характер (рис. 1). С увеличением концентрации до 5 мг/мл значения

Зависимость гидратации фибриногена от дозы γ -облучения ...

ϵ' уменьшается на 3,5 % по сравнению с чистым растворителем, что вызвано увеличением количества связанной белком воды.

Величина мнимой части комплексной диэлектрической проницаемости ϵ'' во всем интервале концентраций практически не отличается от ϵ'' растворителя.

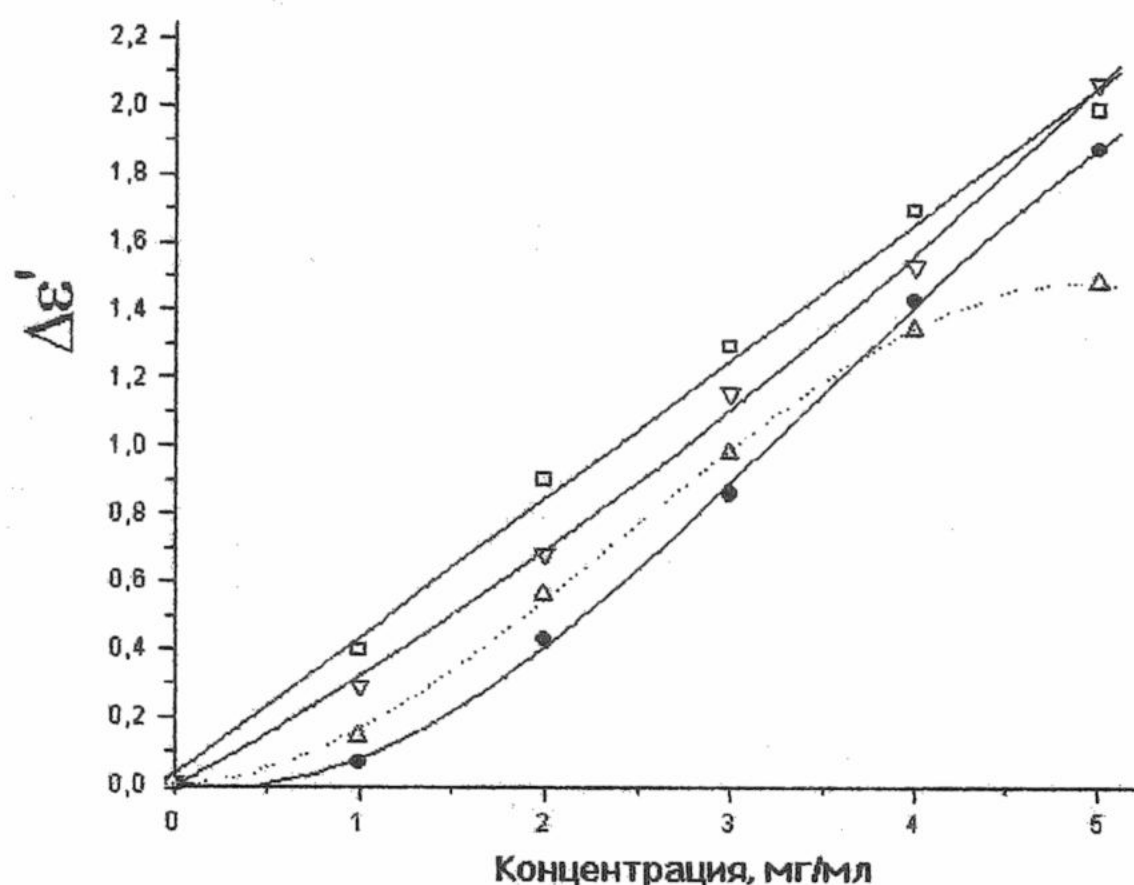


Рис. 1 Зависимость $\Delta\epsilon'$ от концентрации фибриногена: □ – нативный фибриноген; ▽ – 10 Гр; ● – 50 Гр; Δ – 150 Гр.

Концентрационные зависимости $\Delta\epsilon'$ при облучении дозами 10, 50, и 150 Гр нелинейны, что отражает структурные изменения в молекуле фибриногена, возможно агрегацию молекул при дозе 150 Гр (рис.1). Значения $\Delta\epsilon'$ растворов белка, облученных дозами 100 и 200 Гр, имеют линейный характер и совпадают с контролем.

Для выяснения вопроса о структурных изменениях молекулы фибриногена при γ -облучении дозами 5–200 Гр мы исследовали зависимость комплексной диэлектрической проницаемости от дозы облучения при концентрации белка 5 мг/мл (рис. 2 и 3). Во всей указанной области доз значения ϵ' меняются в пределах 1 % от величины ϵ' контрольного образца. Зависимости ϵ' и ϵ'' от дозы имеют экстремумы при 10 – 15, 25 – 35, 50, 100, 140 – 150 Гр.

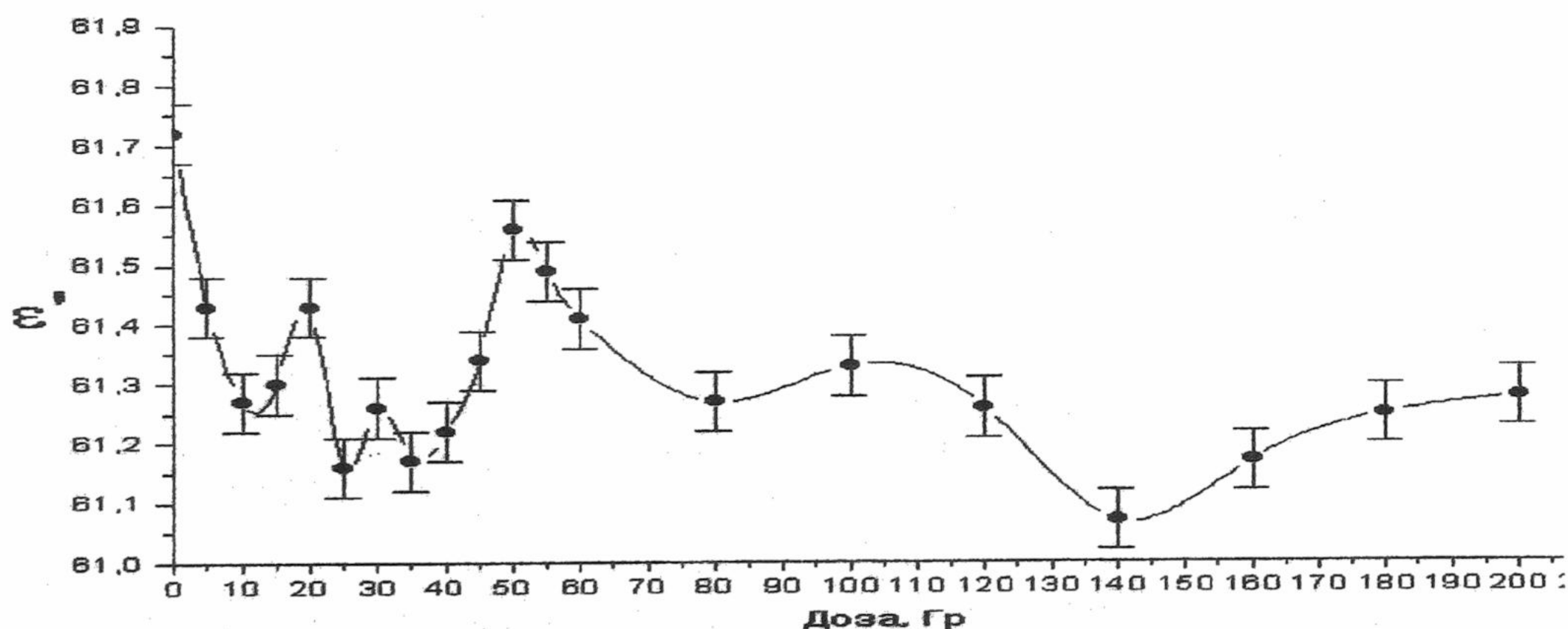


Рис.2. Зависимость ϵ' раствора фибриногена концентрации 5 мг/мл от дозы облучения при температуре 19 °С.

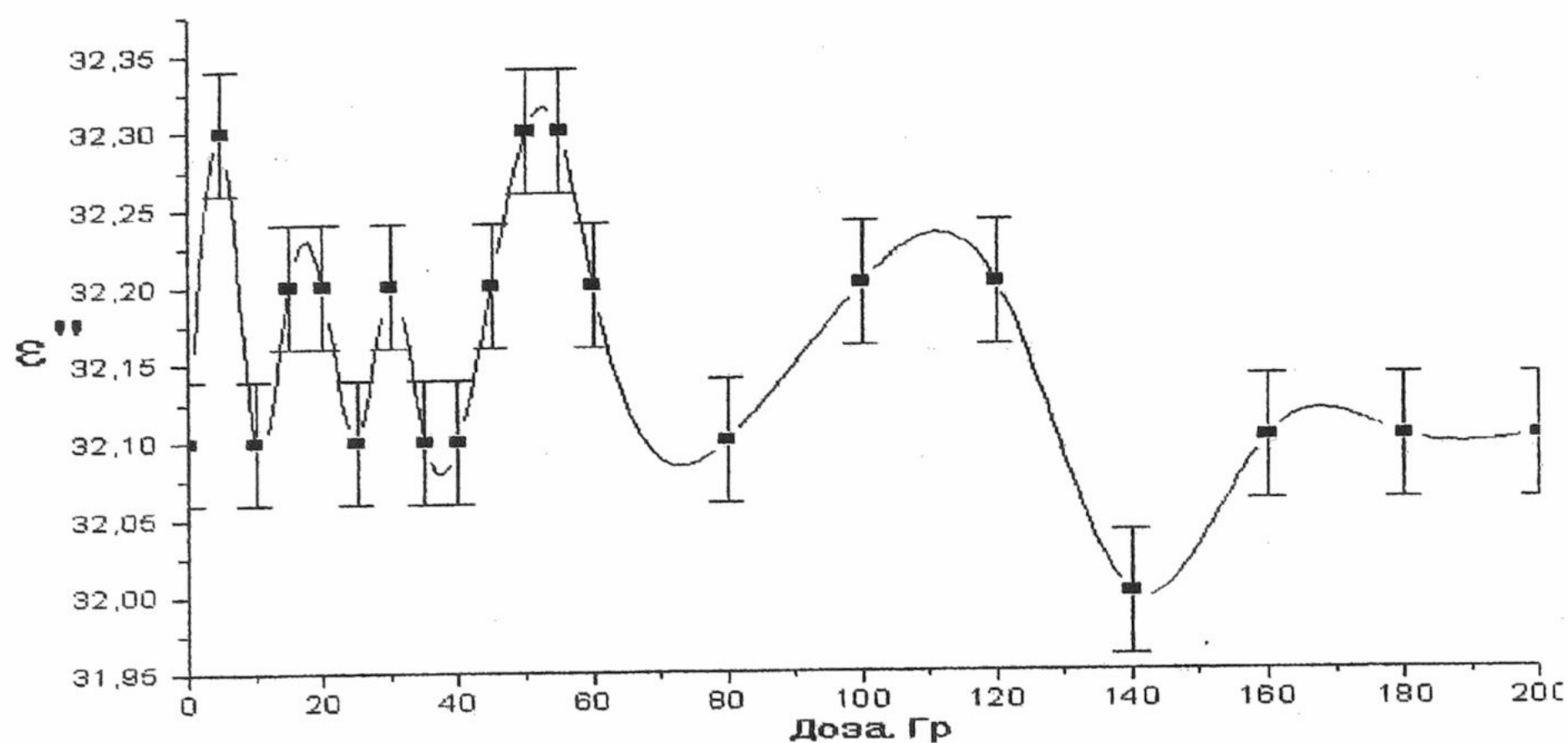


Рис.3. Зависимость ϵ'' раствора фибриногена концентрации 5 мг/мл от дозы облучения при температуре 19 °С.

Полученные изменения ϵ' и ϵ'' , возможно, обусловлены структурными переходами в макромолекуле белка, сопровождающимися изменением количества связанной воды. В области доз до 40 Гр степень гидратации имеет тенденцию к увеличению и при дозе 40 Гр достигает максимума (рис.4). Поскольку молекулы ассоциированной воды образуют водородные связи в основном с полярными центрами молекулы белка, то можно предположить, что увеличение количества гидратной воды связано с увеличением числа доступных для молекул растворителя участков связывания в результате структурного перехода. В качестве таких участков могут выступать, например, полярные аминокислотные остатки Ser, Thr и Gly, содержащиеся в большом количестве в α С-доменах и неупорядоченных участках α -цепи [15].

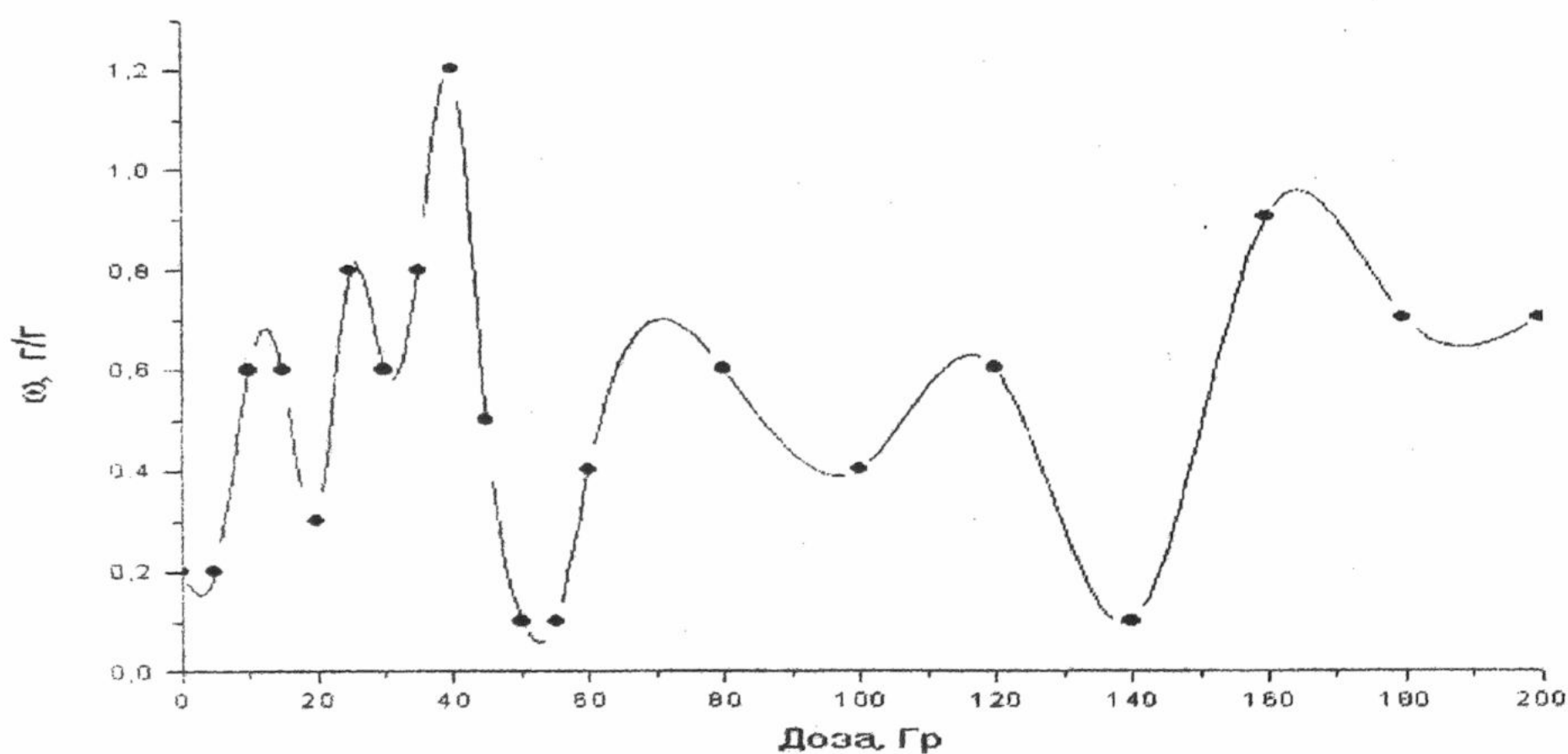


Рис. 4 Степень гидратации фибриногена ω г/г в зависимости от дозы облучения.

При радиационном облучении неупорядоченные полипептидные участки молекулы белка наиболее подвержены действию радикалов, образующихся при радиоллизе воды. Возможно также нарушение взаимного расположения субъединиц фибриногена при разрыве $-S-S-$ мостиков.

Компактные, упорядоченные структуры Е и Д-доменов фибриногена, образуют тройную суперспираль, при этом неполярные боковые группы находятся во внутреннем пространстве суперспирали, а полярные направлены в окружающий растворитель [16]. Неупорядоченные участки цепи, соединяющие компактные структуры, выполняют роль подвижных шарниров, позволяющих доменам и субдоменам смещаться друг относительно друга, меняя конформацию. Такие участки наиболее подвержены разрушающему действию γ -облучения. При малых дозах облучения действию радикалов подвержены наиболее подвижные структуры

Зависимость гидратации фибриногена от дозы γ -облучения ...

молекулы фибриногена — α -С-домены и связующие их с остальной частью молекулы неупорядоченные участки. Структурные переходы под действием радиации могут способствовать увеличению доступности полярных аминокислотных остатков α -цепей для растворителя и повышению степени гидратации. Очевидно, что это приведет к снижению ϵ' (дозы 10–15 Гр).

Дальнейший рост ϵ' при дозах 50 и 100 Гр связан с понижением гидратации и увеличением количества свободной воды в растворе. Эти процессы, вероятно, вызваны структурными изменениями в молекуле фибриногена, в результате которых поверхность белка становится более гидрофобной. Аналогичные результаты получены при исследовании спектров флуоресценции [6]. Согласно модели, представленной в работе [17], в молекуле фибриногена α -С-домены взаимодействуют с Д-доменами посредством гидрофобных связей, причем такое взаимодействие, возможно, обеспечивает экранировку подвижных полипептидных сегментов, соединяющих между собой Е- и Д-домены [15]. Под действием радиационного излучения может произойти отщепление α -С-доменов, в результате чего гидрофобные участки связывания становятся доступными растворителю. Количество связанной воды при этом уменьшается, а ϵ' возрастает. Дальнейшее увеличение дозы облучения будет способствовать все большему нарушению структуры белка. При высоких дозах, в результате рекомбинации продуктов деструкции, происходит агрегация молекул белка [5] и, как следствие, нарушение свертываемости, отмеченные в [18]. В исследованном нами интервале доз структурные изменения затрагивают лишь наиболее доступные для радикалов неупорядоченные участки полипептидной цепи. Компактные области при исследованных дозах не подвергаются разрушающему действию радикалов. В частности, Д-домены фибриногена, обеспечивающие термотропные конформационные переходы в молекуле, сохраняют свою структуру при облучении, в результате чего характер зависимости КДП от дозы сохраняется.

ВЫВОДЫ

Зависимость ϵ' от концентрации белка имеет преимущественно линейный характер, за исключением доз 50 и 150 Гр. В области доз 10–20, 25–30, 50, 100 и 140 Гр наблюдается изменение диэлектрических параметров и степени гидратации фибриногена, что может свидетельствовать о структурных изменениях, происходящих в молекуле.

Понижение КДП в области доз до 40 Гр, по-видимому, вызваны нарушением структуры α -С-доменов и неупорядоченных шарнирных участков полипептидной цепи, связывающих их с остальной частью молекулы. Это может способствовать увеличению доступности полярных аминокислотных остатков α -цепей для растворителя и повышению степени гидратации по сравнению с необлученным белком.

При дозах 50 и 140–150 Гр наблюдается уменьшение количества связанной белком воды вследствие увеличения гидрофобности молекулы фибриногена при отщеплении α -С-доменов, а также в результате агрегации молекул белка начиная с дозы 140 Гр.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Moroff G., George V.M., Siegl A.M., Luban N.L. // *Transfusion*, 1986, V.26, №5, p. 453-456.
2. Stradley S.T., Kao Y.S. // *Am. J. Clin. Patol.*, 1999, V.111, №1, p. 137.
3. Берест В.П., Гаташ С.В., Воробейчик М.А. // *Вісник Харк. ун-ту*, 1999, №450, Біоф. вісн., вип.4, с. 96-99.
4. Prodous K.N., Habraken J.W., Moroff G. // *J. Lab. Clin. Med.*, 1990, V.116, №6, p. 766-770.
5. М. Копес, А. Горска, Г. Дудек-Войцеховска, З. Сзаталло // *Nucleonika*, 1987, V. 32, N 1-3, p. 29-47.
6. Э.А. Ромоданова, Е.К. Андреева, С.В. Гаташ, Т.С. Дюбоко // *Біофізичний вісник*, 1998, вип. 2, с. 105-108.
7. Marchant R.E., Barb M.D., Sainoff J.R. et al. // *Thromb. Haemost.*, 1997, V.77, №6, p. 1048-1051.
8. Методы исследования фибринолитической системы крови. М.: Изд-во МГУ, 1981, 132 с.
9. Николов О.Т., Жилякова Т.А. // *Журн. физ.хим.*, 1991, Т. 65, N 5, с. 1312-1316.
10. М.И. Шахпаронов, Я.Ю. Ахадов // *Журн. структур. хим.*, 1965, Т. 6, N 1, с. 21-26.
11. Buchanan T.J., Haggis J.H., Hasted J.B., Robinson B.J. // *Proc. Roy. Soc.*, 1952, A 213, p. 379-391.
12. Makoto Suzuki, Junji Shigematsu, Takao Kodama // *J. Phys. Chem*, 1996, №100, p. 7279-7282.
13. Дж. Бейли, Д. Оллис. Основы биохимической инженерии., Т. 1, изд-во "Мир", 1989, 692 с.
14. Taatjes D.J., Quinn A.S., Jenny R.J. et al. // *Cell Biol. Int.*, 1997, V.21, №11, p. 715-726.
15. Э.В. Луговской // *Укр. биохим. ж.*, 1982, Т. 54, N 5, с. 578-594.
16. Doolittle R.F., Goldbaum P.M., Doolittle L.R. // *J. Mol. Biol.*, 1978, 120, p. 311-325.
17. Зима В.Л., Луговской Э.В., Медведь Л.В., Гоголинская Т.К., Привалов П.Л. // *Доклады АН СССР*, 1981, Т. 256, №2, с.480-486.
18. Kamat H.N., Nadkarni G.B. / *Radiat Res.*, 1972, Feb: 49(2): p. 381-389.

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ

УДК: 577.3:621.384.8

МАС-СПЕКТРОГРАФІЯ ЗОНИ МІСЦЕВОГО ПРОМЕНЕВОГО
УШКОДЖЕННЯ ШКІРИ

В.А.Мороз

Харківський НДІ медичної радіології ім.С.П.Григор'єва, вул.Пушкінська 82; root@moroz.kharkov.ua

Отримано редакцією 25 лютого 2000 року

З метою адаптації мас-спектрографічного дослідження складу молекулярних фрагментів шкіри виконані дослідження на 157 пацієнтах з місцевими променевими ураженнями. Виконували аналіз співставимості спектрів щодо цієї специфічної патології та її типу, а також можливість відтворення спектрів, відповідаючих локалізації проб тканин, віку і статі пацієнта тощо.

Отримані дані свідчили про доцільність, з метою подальшого проведення роботи в цьому напрямі, аналізовани молекулярні фрагменти розподіляти на три фракції, відповідно, масою до 200 m/e⁻, до 400 m/e⁻ і до 650 m/e⁻. Температурний розподіл досить чітко дозволяв розрізняти фрагменти до 500 m/e⁻. Встановлене залежне від часу, що минув після проведення променевої терапії і типу клінічних проявів променевого ураження (виразка і фіброз), накопичування окремих молекулярних фрагментів. Найбільш чітко це проявлялося щодо поверхневих шарів шкіри.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: променеві ураження, променева терапія, шкіра людини, мас-спектрографія

Незважаючи на те, що гісто-морфологічні зміни біотканин у віддаленому періоді часу після дії іонізуючої радіації, зокрема застосування променевої терапії /ПТ/, достатньо докладно документовані, питання щодо механізмів їх промоції і проблеми нерепарованості місцевих променевих ушкоджень /МПУ/ зостаються актуальними і дотепер [1-3]. Загальне розуміння цих проблем зостається досить невизначеним і має протиріччя [1, 4]. Останнім часом вивчення змін молекулярного складу шкіри при різних її захворюваннях привертає все більшу увагу [5, 6].

В цьому сенсі актуальність має вивчення динаміки молекулярних змін тканинних комплексів у зоні МПУ, зокрема шкіри, які б могли слугувати допоміжним матеріалом щодо визначення нез'ясованих фрагментів проблеми. Втім спеціальної методики щодо застосування мас-спектрографії у відношенні до такого складного за своїм складом об'єкту, яким є шкіра людини, дотепер не існує. Створення її і стало основною метою цього дослідження. При цьому, з метою оцінки спостерігаємих динамічних змін складових біотканин, ми співставляли отримані дані з висновками гістологічних досліджень шкіри.

ПОСТАНОВКА МЕТОДИКИ МАС-СПЕКТРОГРАФІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ

Експериментальні дослідження виконані на гістологічних препаратах 157 хворих (106 жінок і 51 чоловіків у віці від 32 до 76 років) з МПУ різних локалізацій, які готувалися одночасно з вивчаємими пробам мас-спектрографічно. Променеву виразку мали 68, а фіброз - 89 пацієнтів. 75 осіб (47,77%) отримували в анамнезі рентгентерапію, 47 - гама-терапію (29,94%) і 35 (22,29%) - сполучені променеві види лікування. Більшість, а саме 125 хворих (79,62%), отримали один курс ПТ, ще 27 (17,2%) - 2, а 5 пацієнтів - три курси (3,18%). Використані при ПТ дози були відповідні до загальноуживаних щодо цього методу лікування і коливались за СВД від 38 Гр до 74,4 Гр. В роботі приймали до уваги тільки дані пацієнтів третьої клінічної групи спостереження (практично здорові особи), з відсутністю рецидивів онкозахворювання.

Мас-спектрографічно досліджено 250 проб тканин (шкіра і підшкірна клітковина), взятих оперативно у хворих з вогнища МПУ. Співставлення провадили з умовною "нормою", розробленою за еталонними спектрами відповідно конкретної ділянки тіла пацієнта. Десикація проб тканин, попередньо законсервованих у 4% розчині ЕДТА [7], проводилася послідовно в серії спиртів. Отриманий матеріал гомогенізували з використанням ультразвукового подрібнювача і вносили навискою в 50 мг прямим вводом в йонне джерело мас-спектрометра "Finnigan MAT 4615-B" (США), де останній піддавався балістичному нагріву. Сам нагрів виконували в скляній стандартній посудині, яка поміщалася в зону нагріву. Апарат забезпечував іонізацію як самих молекул, так і виникаючих при цьому молекулярних фрагментів. Аналіз отриманих в процесі деструкції і випарювання з'єднань виконувався за допомогою вбудованого в апарат комп'ютера.

Патогістологічні висновки щодо вивчаємих тканинних проб, отримані за даними світлової мікроскопії доповнювали електронномікроскопічним дослідженням, відбір проб для якого провадили прицільно. Помічені зміни ранжирували бальною оцінкою і використовували для подальшого опрацювання отриманих тенденцій щодо спектру елімінованих мас-спектрографічно молекулярних фрагментів. При цьому за основу розуміння порушень клітинного і тканинного диференціювання взято розробки McKusick V.A. [8].

Отримані результати опрацювали засобами варіаційної статистики пакетами MathCAD 7.0 та Statgraf. Використовували рекомендації Hassard T.H. щодо особливостей біомедичних досліджень [9].

В процесі опрацювання методики робили серійні забори проб тканин з різноманітних шарів шкіри (поверхневий, власне дерма, підшкірно-жирова клітковина тощо). Групуванням за етіологією (шкіра без опромінення і при МПУ, з різноманітних ділянок тіла, відповідно статі тощо) з'ясовували характерні йонні і еліміновані фрагменти для проб. Внаслідок численних зіставлень була створена методика забору і внесення в мас-спектрограф, а також потрібна однотипність гомогенізації досліджуваних проб, що забезпечувала відповідну точність отримуваних результатів. Були розроблені еталонні спектри шкіри для різноманітних умов (локалізація, стать і вік), що надалі слугували відправними при статистичній обробці.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ

При балістичному нагріванні проб шкіри і підшкірної клітковини речовини, що входять до їх складу, як з'ясувалося, можна достатньо чітко поділити по летючості на три фракції: 1) легка - її виділення проходило при температурах до 150°C. Сюди відносилися фрагменти з молекулярною масою до 200 m/e⁻; 2) середня - виділення відбувалося при температурах від 150 до 250°C. Її склали молекули з масою до 400 m/e⁻ і 3) важка - виділення завершувалося при нагріві до 300°C. В неї входили переважно фрагменти з молекулярною масою до 650 m/e⁻ (рис. 1). В подальшому аналізі мали на увазі, що для молекул з ваговими значеннями понад 500 m/e⁻ фізичні значення внутрішньо- і міжмолекулярних зв'язків за умов підведення теплової енергії ззовні практично вирівнюються. Тому значно більші за масою фрагменти намагалися взагалі не розглядати, а саме такий порядок обов'язково оцінювався нами, як фрагмент більшого хімічного з'єднання. Розподіл на три пропоновані фракції вважається нам доцільним через те, що у першу з них, поряд з фрагментами молекул, входили і цільні з'єднання, у другу - переважно фрагменти, так званого, "першого порядку", а третя була представлена сумішшю фрагментів, маючих відношення, як думається, переважно до значних за масою білкових сполук.

В нормі в мас-спектрі спостерігали і загальні для різних шарів шкіри з'єднання та їх фрагменти, представлені піками 69.1, 81.1, 133.2, 159.2, 199.1. Переважною більшістю вони відносились до групи сполук, пов'язаних з функціями потовиділення і утворення, а також подальшого розкладу, шкірного сала. Саме сальні і потові залози, які порівняно глибоко розташовані в дермі, як думається, давали ці сполуки до складу гомогенізованої суміші досліджуємої проби.

В той же час при МПУ загальний спектр елімінованих сполук був значно збіднений, що співпадало з гістологічними змінами тканин в бік їх дегенеративних змін і, деякою мірою, прямо залежало від ступіню загального зменшення в них спеціалізованих елементів (рис.2). Крім того, було встановлено, що у хворих з МПУ значно підвищувалися піки 551-ї і 549.3-ї маси. Причому останній був завжди чітко визначеним і перевищував подібний в нормі приблизно в 3 рази. Що дозволяло, зокрема, прийти до висновку про потроєння вмісту відповідної сполуки у досліджуваних пробах за цих умов. Ідентифікація сполуки за допомогою аналізатора мас-спектрографа вказала на наявність складного з'єднання з високим вмістом у його складі атомів Cl. Маса 549.3, не виключено, є одним з фрагментів цього значного за масою сполучення. Цілком можливо, що вона становить проміжний продукт обміну ліпо- або фосфопротеїдів, і відноситься до класу мембранних протеїдів [5, 10].

У той же час малися деякі відмінності щодо складу елімінуємих фрагментів і у залежності від строків після проведення ПТ. Так, у відносно незначні строки (до 1,5 року), в шкірі подвоювався пік 126,2, а також наростали, хоч і в значно меншій кількості, з'єднання з масами близько 155,1 та деякі інші. Але якщо друга зі згаданих мас була присутня в пробах тканин і при подальшому спостереженні (до 5 і більше років після проведення ПТ), то перша при цьому майже у всіх випадках зникала.

Існували істотні розбіжності у співвідношеннях фрагментів середньої і важкої фракцій (з молекулярною масою більше 200 m/e⁻) щодо типу МПУ. При променевих фіброзах відзначалося істотне збіднення спектру, характерне для рубцових структур шкіри. У той же час проби з зони променевих виразок шкіри давали чималий розкид отримуваних даних, судячи з усього, якоюсь мірою пов'язаний з присутністю в пробах шкіри решт використовуваних пацієнтом лікарських речовин.

В підшкірно-жировій клітковині, яка і в нормі давала більш бідний за вмістом елементів спектр фрагментів, тенденції змін у маспектрограмах були іншими. Причому зміни тут, порівняно зі шкірою, були явно незначні і торкалися виключно молекулярних фрагментів масою до 160 m/e⁻.

Одержані за допомогою мас-спектрографії дані свідчили, з одного боку, про значні зсуви у функціонуванні досліджуваних ділянок шкіри, які свідчили про значне збіднення складу тканин на продукти обміну зовнішнього виділення (піт, шкірне сало тощо), а з іншого - на накопичення складових мембраноутворюючого типу. При тому, як думається, це накопичення представляється досить обмеженим типом молекул, що може говорити про досить прицільний рівень порушень механізмів тканиноутворення. І які можуть бути принциповими щодо промоції зокрема МПУ, а також являти собою прямий наслідок дії ПТ.

Представляється, що за умов подальшого уточнення методології дослідження, мас-спектрографія шкіри може дати цінний матеріал щодо розуміння змін молекулярних комплексів при МПУ.

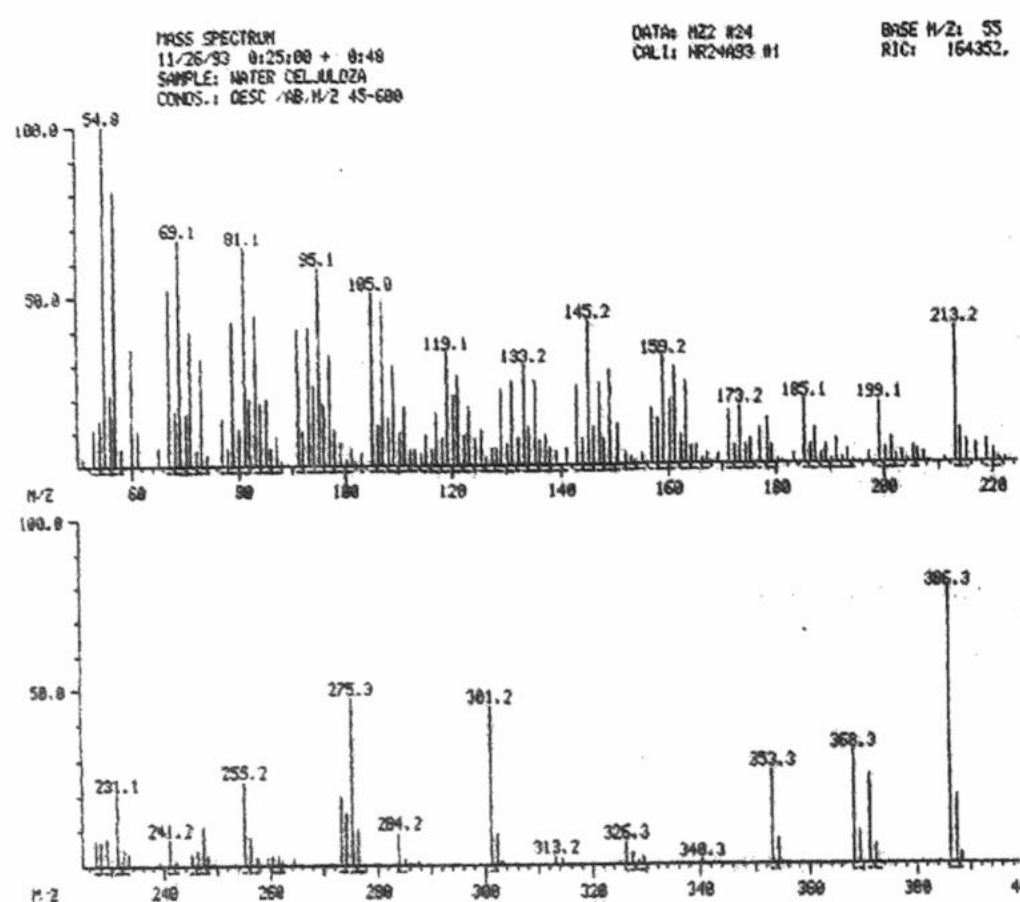


Рис. 1. Мас-спектр еталонної "здорової" шкіри

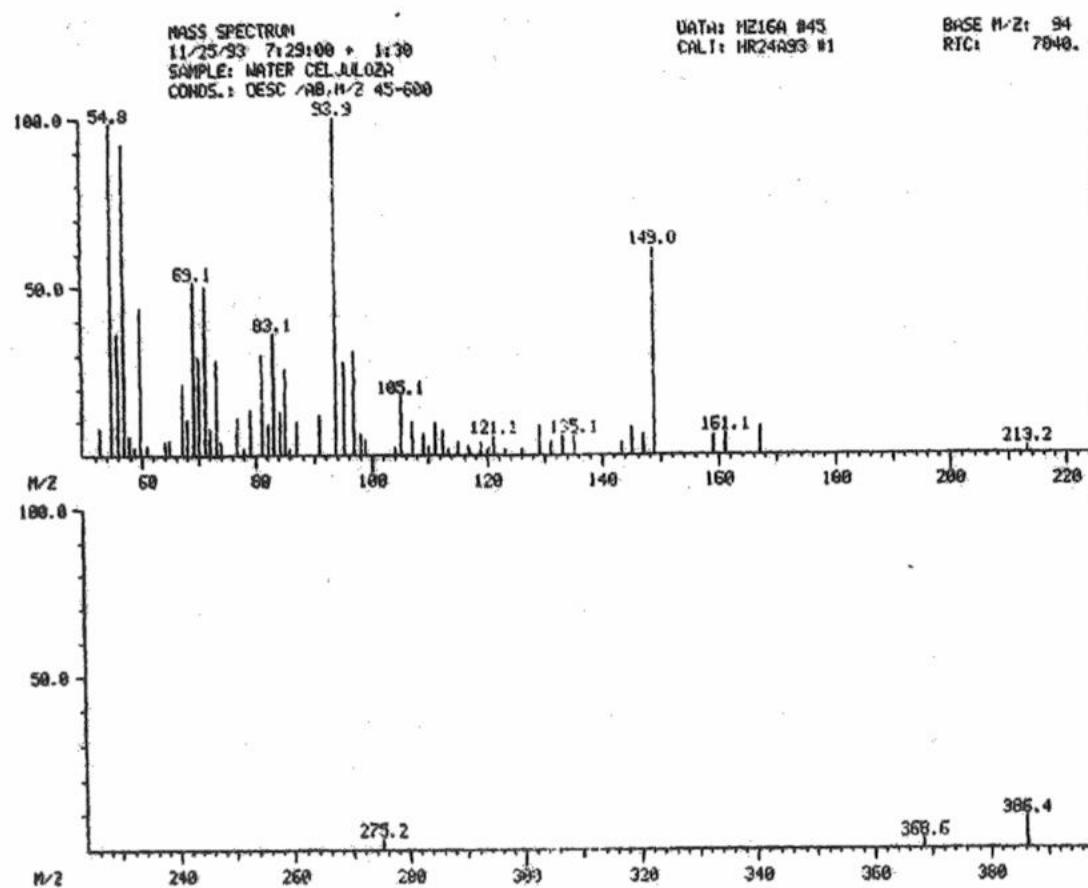


Рис. 2. Мас-спектр ділянки променевого фіброзу

ВИСНОВКИ

Отримувати за допомогою мас-спектрографічного дослідження шкіри молекулярні фрагменти доцільно, з метою подальшого урахування їх проходження, розподіляти на три фракції: а) з молекулярною масою до 200 m/e⁻; б) з масою до 400 m/e⁻ і в) з молекулярною масою до 650 m/e⁻. Температурний розподіл при елімінації досить чітко дозволяв їх розрізняти фрагменти до 500 m/e⁻.

На підставі проведених досліджень встановлено залежне від часу після ПТ і типу клінічних проявів МПУ (виразка і фіброз), накопичування окремих молекулярних фрагментів. Найбільш чітко це проявлялося щодо поверхневих шарів шкіри.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Chopra K.F. et al. Linear basal cell carcinomas: report of multiple sequential tumors localized to a radiotherapy port and review of the literature // *Tex. Med.* - 1997. - №7. - p. 57-59.
2. Yokomizo Y. Effect of phosphatidylcholine on the percutaneous penetration of drugs through the dorsal skin of guinea pigs in vitro, and analysis of the molecular mechanism, using attenuated total reflectance-Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy // *J. Control Release.* - 1996. - v.42. - №12. - p. 249-262.
3. Haraguchi H, Fujimori E, Inagaki K Trace element analysis of biological samples by analytical atomic spectroscopy // *Methods Mol Biol.* - 1998. - v.108. - №3. - p.389-411.
4. Wallner K., Roy J., Harrison L. Dosimetry guidelines to minimize urethral and rectal morbidity following transperineal 125I prostate brachytherapy // *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics.* - 1995. - v.32. - №2. - p.465-471.
5. Mikami T., Kashiwagi M., Tsuchihashi K., Akino T., Gasa S. Substrate specificity and some other enzymatic properties of dihydroceramide desaturase (ceramide synthase) in fetal rat skin // *J Biochem (Tokyo).* - 1998. - v.123. - №5. - p.906-911.

6. Liu S.M., Figliomeni S. Gas chromatography/mass spectrometry analyses of [2,3,3-d3] serine, [2,3,3-d3] cysteine and [3-13 C] cysteine in plasma and skin protein: measurement of transsulphuration in young sheep // Rapid Commun Mass Spectrom 1998.- v.12.- №17.- p.1199-203
7. Gillece-Castro B.L. et al. Peptide characterization by mass spectrometry // Methods Enzymol.- 1996.- v.271.- №3.- p. 427-448.
8. McKusick V.A. Heritable disorders of connective tissue.- St. Louis.- 1972.- 218 p.
9. Hassard T.H. Understanding biostatistics.- Mosby: Y.B.- 1991.- 292 p.
10. Doering T., Holleran W.M., Potratz A., Vielhaber G., Elias P.M., Suzuki K., Sandhoff K. Sphingolipid activator proteins are required for epidermal permeability barrier formation // J Biol Chem.- 1999.- v.274.- №16.- p.11038-11045

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК .591.15.16

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОГО СООТНОШЕНИЯ СКОРОСТЕЙ
ОТТАИВАНИЯ К ЗАМОРАЖИВАНИЮ,
ПОЗВОЛЯЮЩЕГО РЕАЛИЗОВАТЬ ВЫСОКУЮ
СОХРАННОСТЬ ДЕВИТРИФИЦИРОВАННЫХ
ЭМБРИОНОВ МЛЕКОПИТАЮЩИХ.****Л.В. Горбунов, И.А. Морозова, Л. Н. Герасименко***Харьковский биотехнологический центр, 312120 Харьков, п/о Кулинич,**E-mail cryo@animal.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 22 июня 2000 г.

В работе предложен технологичный метод измерения температуры хромель-копелевой и медь-константановой термопарами. Метод основан на подстраивании коэффициента усиления до заданной величины с целью устранения систематических погрешностей. Абсолютная (относительная) погрешности определения температуры для всех представленных схем измерения термопарой составляют в диапазоне от 100 до 0°C не более 0,5°C (0,5%) и от 0 до -200°C - 1,3°C (0,6%), соответственно. Разработанный метод позволяет с высокой точностью определять скорости замораживания и оттаивания, необходимые для достижения эффекта витрификации. Установлено оптимальное соотношение величин скоростей оттаивания $V_{от}$ к замораживанию $V_з$ ($V_{от}/V_з \geq 1,5$), соблюдение которого позволяет избежать процесса рекристаллизации при оттаивании, что даёт возможность повысить уровень сохранности деконсервированных эмбрионов мыши на 15,8% по сравнению с сохранностью, получаемой в случае применения традиционных методов витрификации ($V_{от}/V_з \text{ } ^\circ\text{C}/\text{сек} = 0,8$).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сохранность, витрификация, эмбрионы мыши, метод измерения температуры, погрешность, калибровка, термопара.

Традиционные способы витрификации ооцитов и эмбрионов млекопитающих основаны на применении высоких концентраций растворов криопротекторов (50% и более) в сочетании с высокими скоростями замораживания-оттаивания ($V_з = 28 \div 30^\circ\text{C}/\text{сек}$, $V_{от} = 20 \div 25^\circ\text{C}/\text{сек}$). При этом пагубность кристаллообразования в большей степени проявляется при оттаивании [1].

Цель данной работы заключалась в определении оптимального соотношения скоростей оттаивания к замораживанию, обеспечивающего высокий уровень сохранности девитрифицированных эмбрионов мыши.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Калибровку медь-константановых и хромель-копелевых термопар проводили с точностью 0,1°C при помощи термодатчика, входящего в комплект замораживателя "Minicool". Полученные результаты обрабатывали при помощи стандартной программы "Stadia", посредством которой были получены регрессионные кривые ($R \geq 0,99$). Относительная погрешность измерений оценивалась как отношение величины абсолютной погрешности к величине температурного диапазона, в котором проводилась калибровка термопары [2]. Величина предельной точности измерения температуры вычислялась по следующей формуле: $S_{абс} = A/E$, где A - точность измерения прибора, E - его чувствительность. $E = \Delta U / \Delta T$, где ΔU - изменение напряжения или сопротивления в температурном диапазоне ΔT .

Режим снижения температуры регистрировали при помощи графопостроителя Н-307. Вычисление скорости снижения температуры при замораживании проводили в диапазоне зоны эвтектики используемого раствора, а при оттаивании - в температурной зоне рекристаллизации. Число опытов в каждом эксперименте составляло 10.

Посредством применения визуального метода определяли вероятность образования кристаллов ($P_{кр}$) при замораживании и размораживании пластиковых соломинок, заполненных раствором глицерина и сахарозы общей концентрацией 50% [v/v]. Наличие кристаллов соответствует вероятности кристаллообразования $P_{кр} = 1$, а их отсутствие - $P_{кр} = 0$ [3]. Полученные результаты были статистически обработаны в соответствии с общепринятыми методами.

Эмбрионы мыши получали на стадии поздней морулы или ранней бластоцисты согласно общепринятой методике. В качестве эквilibрирующего раствора криопротектора использовали раствор глицерина концентрацией 15%, [V/V], а витрифицирующего - 30% глицерина и 0,73M сахарозы. Время экспозиции

Определение оптимального соотношения скоростей оттаивания ...

в эквilibрирующем растворе составило 10 минут при температуре $20 \pm 2^\circ\text{C}$, а в витрифицирующем - $0,2 \div 1$ минуты. Эмбрионы заряжали в пластиковые соломинки с наружным диаметром 1,8 мм. Замораживание осуществляли посредством прямого погружения соломинок в жидкий азот, а оттаивание - в водяную баню, нагретую до температуры 40°C , или в спиртовую той же температуры с применением магнитной мешалки. Для выведения криопротектора после размораживания соломинок использовали раствор сахарозы концентрацией 0,7М. Все применяемые в ходе работы среды были приготовлены на основе раствора Дюльбекко (PBS) с добавлением 10% телячьей фетальной сыворотки.

РЕЗУЛЬТАТЫ

При витрификации биообъектов происходит стеклование вне- и внутриклеточной среды. Для получения эффекта стеклования важно задавать определенные скорости замораживания и оттаивания. Для решения поставленной задачи нами разработан точный и вместе с тем технологичный метод измерения температуры при помощи хромель-копелевых (ХК) и медь-константановых (МК) термопар. По литературным данным максимальная точность измерения температуры при помощи термопар составляет $\pm 0,05^\circ\text{C}$ [4]. Однако на практике погрешность измерения значительно больше и составляет $0,5^\circ\text{C} \div 5^\circ\text{C}$. Причиной этого являются систематические погрешности, обусловленные способом изготовления термопары, материалом, из которого она состоит, диаметром и длиной проводов, целостностью их электроизоляционного покрытия, параметрами усилителя и регистрирующего прибора, величиной температурного диапазона в котором проводилась калибровка термопары [5].

Выбор различных способов проведения измерения с использованием медь-константановых и хромель-копелевых термопар, откалиброванных при температуре нерабочего спая при -196 и 0°C , обусловлен необходимостью регистрации высоких и низких скоростей теплообмена в различных температурных диапазонах, соответственно.

В ходе проведения исследований нами апробирован способ калибровки термодатчиков, применяемых в различных схемах измерения температуры, по трем реперным точкам. При помощи регрессионного анализа найдены уравнения, описывающие зависимость их электропроводящих свойств от температуры для разных типов термопар, откалиброванных в положительном и отрицательном диапазоне температур (табл. 1).

Таблица 1. Точность определения температуры при различных схемах измерения хромель-копелевой (ХК) и медь - константановой термопарой (МК).

Выбор типа термопары и схемы измерения	Диапазон измерения температуры, $^\circ\text{C}$	Уравнение регрессии, описывающее зависимость ТЭДС термопары, $V(\text{mV})$	Коеффициент усиления ТЭДС	Погрешность определения температуры		
				Абсолютная		Отн. эксп. %
				теор., $^\circ\text{C}$	эксп., $^\circ\text{C}$	
МК ($T_{\text{н}}=0^\circ\text{C}$)	$100 \div 0$	$T=23,81V$	33	0,1	0,5	0,5
	$0 \div -196$	$T=-2,684V^2-23,29V-1,957$	32	0,14	1,2	0,6
МК ($T_{\text{н}}=-196^\circ\text{C}$)	$50 \div -196$	$T=-2,84V^2+50,45V-190,7$	15	0,4	1,3	0,5
ХК ($T_{\text{н}}=0^\circ\text{C}$)	$100 \div 0$	$T=11V-1$	18	0,07	0,4	0,4
	$0 \div -196$	$T=-0,7152V^2+13,96V-0,2865$	17	0,1	1,2	0,6
ХК ($T_{\text{н}}=-196^\circ\text{C}$)	$50 \div -196$	$T=-4,856V^2+57,03V-185$	8	0,2	1,3	0,5

$T_{\text{н}}$ —температура нерабочего спая термопары.

Представленный в литературе способ калибровки термопар на основе использования регрессионных моделей [6] имеет существенный недостаток: представленная модель не учитывает изменяющуюся зависимость ТЭДС от индивидуальных свойств термопары вследствие влияния всех вышеперечисленных факторов. Введение поправки для каждого уравнения позволяет снять влияние этих факторов, причем ошибка определения температуры при использовании поправочного коэффициента составляет не более 0,6% во всем температурном диапазоне от $+100^\circ\text{C}$ до -196°C . Для компенсации систематических погрешностей, обусловленных индивидуальными свойствами термопары, мы решили вместо ввода поправочного коэффициента в регрессионные уравнения применить способ подстраивания коэффициента усиления до заданной величины. Показания имитатора N на приборе отражают изменения коэффициента

усиления K и позволяют установить его численные значения по установленной зависимости: $N = 4,468 \cdot K$.

При замораживании соломинок посредством прямого погружения в жидкий азот со скоростью охлаждения $V_3 = 27,7 \pm 2,4^\circ \text{C/сек}$ не наблюдается помутнение раствора, что свидетельствует об отсутствии образования кристаллов, тогда как при оттаивании в водяной бане, нагретой до температуры 40°C ($V_{от} = 22 \pm 2,7^\circ \text{C/сек}$) имеется частичное помутнение. Данный эффект, в первую очередь, зависит от интенсивности обмерзания воды на поверхности соломинки, что, в свою очередь, снижает скорость оттаивания биообъекта. Заменяв водяную баню на спиртовую ($T = 40^\circ \text{C}$) и применив магнитную мешалку с целью увеличения интенсивности теплообмена между теплоносителем и контейнером, удалось увеличить скорость оттаивания до $V_{от} = 42 \pm 2,7^\circ \text{C/сек}$ и тем самым избавиться от помутнения среды.

Таким образом, была определена величина соотношения скоростей оттаивания к замораживанию, которая не должна быть менее 1,5. В противном случае, при оттаивании происходит процесс рекристаллизации, что негативно сказывается на сохранности биообъекта.

Для подтверждения данного положения проведены исследования по замораживанию эмбрионов мыши в пластиковых соломинках ($d = 1,8 \text{ мм}$) посредством прямого погружения в жидкий азот ($V_3 = 27,7 \pm 2,4^\circ \text{C/сек}$). Часть соломинок разморозили при скоростях оттаивания, соответствующих традиционному методу витрификации ($V_{от} = 22 \pm 2,7^\circ \text{C/сек}$), при которых выполняется соотношение $V_{от}/V_3 = 0,8$. Остальные соломинки разморозили при скоростях теплообмена ($V_{от} = 42 \pm 2,7^\circ \text{C/сек}$), для которых выполняется установленное соотношение $V_{от}/V_3 \geq 1,5$. Повышение скорости оттаивания позволило увеличить уровень сохранности деконсервированных эмбрионов мыши до 73,3 % (33/45), в то время как при традиционном способе витрификации сохранность составила 57,5 % (23/40).

ВЫВОДЫ

1. Предложен технологичный метод измерения температуры, основанный на устранении систематических погрешностей, возникающих в ходе измерений, при котором абсолютная (относительная) погрешности определения температуры для всех представленных схем измерения термпарой в диапазоне от 100 до 0°C составляют не более $0,5^\circ \text{C}$ (0,5%), а от 0 до -200°C - $1,3^\circ \text{C}$ (0,6%), соответственно.

2. Установлено оптимальное соотношение величин скоростей оттаивания $V_{от}$ к замораживанию V_3 ($V_{от}/V_3 \geq 1,5$), соблюдение которого позволяет избежать процесса рекристаллизации при оттаивании, что даёт возможность повысить уровень сохранности деконсервированных эмбрионов мыши на 15,8% по сравнению с сохранностью, получаемой при традиционных методах витрификации ($V_{от}/V_3 = 0,8$).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boutron, P., Menhi, P. Kinetics of ice crystallization in solutions. // Cryobiology. - 1986. V. 23, №4. - p.88-102.
2. Зайдель А. Н. Погрешности измерений физических величин. - Л.: Наука, 1985, - 112 с.
3. Massip A., Van der Zwaimen P., Ectors F. Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. // Theriogenology. V.27. - 1987. - p.69-79.
4. Вепшек Я. Измерение низких температур электрическими методами. - М.: Энергия, 1980. - 224 с.
5. Брагин Б. К., Тетюева Р. Н. Термoeлектрическая однородность хромелевых, копелевых, алюминиевых и медных проволок при низких температурах. - Измерительная техника, 1964, № 6, - 30-31 с.
6. Спесивцев В.В. Градуировка термoeлектрических термометров и определение их динамических характеристик // Методические указания к лабораторным работам. Х.: ХАИ, 1988 - 36 с.

ABSTRACTS

A THEORETICAL STUDY OF THE DOUBLE-PROTON PHOTOTAUTOMERISM IN 7-AZAINDOLE DIMER

V.I. Danilov¹, O.N. Slyusarchuk¹, J.J. Steward², J.L. Alderfer³

¹Department of Quantum Biophysics, Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Zabolotny St., 150, Kiev, 03143, Ukraine; ²Stewart Computational Chemistry, 15210 Paddington Circle, Colorado Springs, CO 80921-2512, USA; ³Biophysics Department, Roswell Park Cancer Institute, Buffalo, NY 14263, USA

A detailed study of the potential energy curves for the double-proton transfer along hydrogen bonds (H-bonds) in the 7-azaindole (7AI) dimer in the ground (So) and lowest singlet excited (S) states are presented. Calculations were carried out by the semi-empirical AMI method including configuration interaction. It is shown that in the S state the rare tautomeric form of the dimer is more stable than its normal form and it can become responsible for the spectrum of long-wave fluorescence. Calculations of the 7AI dimer with full geometry optimization in comparison to ones where the H...N7 distance in the NI-H...N7 bonds was not optimized provides more realistic parameter values characterizing the potential curves of H-bonds. The simplest model system representing 7AI dimer normal and rare forms, which allows to perform calculations for both forms of the dimer in the So and S states with full geometry optimization is suggested. It is found that the minimum corresponding to the rare tautomeric form of the dimer is deeper than the normal form. This result supports main conclusion made from the potential curves. Comparison of the calculated maxima of the absorption and fluorescence bands for the rare dimer form shows a large Stokes shift of green emission which is close to the one observed in experiments.

Key words: 7-azaindole, hydrogen bond, potential curves, proton transfer, phototautomerism, fluorescence.

PHYSICAL MECHANISMS OF INTERACTION OF ACTINOCIN DERIVATIVES WITH DNA.

1. INFLUENCE OF WATER ON THE INTERACTION WITH THYMUS DNA.

M.A. Semenov, A.I. Gasan, V.Ya. Maleev, T.V. Bol'bukh, N.N. Sagaidakova, E.B. Kruglova, A.N. Veselkov¹, E.H. Glibin².

Institute of Radiophysics and Electronics, N A S. of Ukraine, 12 Ak. Proskury St, Kharkov, 61085, Ukraine, e-mail: maleev@ire.kharkov.ua; ¹Sevastopol State Technical University, ²Sankt-Peterburg State Technological Institute

Peculiarities of formation of crown-actinocin with thymus DNA complexes in humid films and solutions have been investigated using IR, LJV and visible spectroscopy, as well as piezogravimetry methods. It has been shown that intercalation of phenoxazone rings of actinocin into a stack of nitrogenous bases, and formation of the stable hydrate structure of complex at the expense of interaction of water molecules with polar groups of the ligand and hydrate-active centers of DNA, are the most probable mechanisms of binding DNA with the ligand. Crown-ether groups of the ligand, interacting with DNA counterions, bind with water molecules and phosphates, and it does not let deoxyribose ring to transform into the C2'-endo-conformation at high water activities. Thermostability of the DNA-L complex has been found higher as compared with the pure DNA.

Key words: DNA. complex, hydration, spectroscopy, actinocin.

STATISTICAL-THERMODYNAMICAL MODEL OF HETERO-ASSOCIATION OF AROMATIC MOLECULES IN AQUEOUS SOLUTION BASED ON ¹H-NMR DATA

D.A. Veselkov¹, M.P. Evstigneev, D.B. Davies¹, A.N. Veselkov

Department of physics, Sevastopol State Technical University, Sevastopol-99053, Ukraine

¹Department of chemistry, Birkbeck College, University of London, WC1H 0PP, UK

A statistical-thermodynamical model of hetero-association of aromatic molecules has been developed for interpretation of NMR data. In the proposed model, unlike the previous one [12], there are no limitations on the equilibrium self-association constants of the molecules and also the edge effects are taken into consideration, i.e. the dependence of the proton chemical shift on the position of the molecule in aggregate situated inside, at the edge or in the hetero-stack of the heterocomplex. The model was used for analysis of hetero-association of phenanthridinium dye, ethidium bromide (EB), and anthracycline antibiotic, daunomycin (DAU), in aqueous solution. The calculation of the association parameters of the molecules has been carried out using ¹H-NMR spectroscopy (500 MHz). Experimental concentration and temperature dependences of proton chemical shifts of interacting aromatic molecules have been studied. The equilibrium constant of hetero-association is found to be substantially higher than the self-association constants of EB and DAU. Analysis of the structural and thermodynamical characteristics of EB-DAU complexation indicates the possibility of an extra stabilisation of 1:1 hetero-complex of the molecules due to H-bond formation between 3-amino group of EB and 9-MeCO group of DAU.

Key words: statistical-thermodynamical model, hetero-association, aromatic molecules, daunomycin, ethidium bromide

HYDRATION OF THE VARIOUS STRUCTURAL FORMS OF POLYRIBOCYTIDILIC ACID AND ITS COMPONENTS BY A MONTE CARLO METHOD. 3. THE ROLE OF WATER IN THE STABILIZATION OF HELICAL STRUCTURE OF POLYRIBOCYTIDILIC ACID

A. V. Shestopalova, D. B. Anischenko¹, V. Ya. Maleev.

Institute for Radiophysics & Electronics, NAS of Ukraine, 12 Acad. Proskura St, 61085, Kharkov;

¹Kharkov National University. 4 Svobody Sq., 61077. Kharkov, Ukraine

In the first time the investigation of hydration the structural components of polyribocytidilic acid - poly(rC) - on molecular level has been performed by Monte Carlo method. As the object to be studied neutral and protonated form of cytidine monophosphate, their hydrogen-bonded pair, dinucleoside monophosphate of neutral cytosine, tetranucleotide in single-strand and its duplex in double-strand of half-protonated poly(rC) have been studied. The hydration of ribose and phosphate group for neutral and protonated form of cytidine monophosphate has been described. The analysis of energetic and structural characteristics considering systems allowed us to make such conclusions. The main factor of structure stabilisation for helical systems is the number of hydrogen bonds formed by water molecules occupying bridges positions and forming water networks. The stability of a double-strand poly(rC) is connected both with interaction between opposite chains and formation of specific structure of water molecules around it. In conclusion a model of the hydration of double-strand poly(rC) is proposed.

Keywords: cytidine monophosphate, polyribocytidilic acid, hydration, Monte Carlo simulation.

QUANTUM CHEMICAL STUDY OF THE MOLECULAR STRUCTURE OF PROLINE CONTAINING CYCLIC DECAPEPTIDE ANTAMANIDE

S.G. Stepanian, O.V. Durneva

Institute for Low Temperature Physics and Engineering NAS of Ukraine 47 Lenin Ave., Kharkov 61164 Ukraine.

e-mail: stepanian@ilt.kharkov.ua

We present results of the quantum chemical study of the molecular structure of cyclic decapeptide antamanide - cyclo (-Val₁ - Pro₂ - Pro₃ - Ala₄ - Phe₅ - Phe₆ - Pro₇ - Pro₈ - Phe₉ - Phe₁₀ -), as well its cluster with 22 water molecules which model the first hydration shell. Analysis of the structural parameters of the proline residues which form β turns of antamanide in isolated and hydrated states allows us to determine that Pro₂ and Pro₇ residues of the antamanide are the structural analogues of the proline conformer Ia. On the other hand, Pro₃ and Pro₈ residues are the structural analogues of the proline conformer IIa. It demonstrates that different sets of the molecular parameters corresponding to the proline conformers Ia and IIa should be used for the modelling of the proline residues in β - turns of peptides. Total energy of the intermolecular interactions in the antamanide+22 H₂O cluster is found to be -142,3 kcal/mol. The interaction energy between antamanide and water molecules is -110,7 kcal/mol and the interaction energy between water molecules is -31,6 kcal/mol.

Key words: antamanide, proline, quantum chemical calculations, AMI, molecular structure, hydration shell

STUDY OF Cu²⁺ IONS EFFECT ON POLY(I) CONFORMATION IN SOLUTION BY VISCOMETRY AND IR SPECTROSCOPY METHODS.

D. N. Grigoriev, G. Zhuchkova, V. Andrushchenko, S. V. Kornilova, Yu. P. Blagoi.

Institute for Low Temperature Physics and Engineering, NAS of Ukraine, 47 Lenin Ave., 61164, Kharkov, Ukraine

The present work is aimed at studies on the Cu²⁺ interaction with poly(I) in solution by viscometry, UV and IR spectroscopy methods. Dependences of the intrinsic viscosity $[\eta]$ and helicity degree Θ of poly(I) on Cu²⁺ contents and IR spectra of poly(I) complexes with Cu²⁺ in solution were obtained. The data obtained permitted to calculate the binding degree (C) and association constants (K) of Cu²⁺ ions interacting with bases of single-stranded poly(I). It is shown that at small concentrations (lower than 10⁻⁵ M) the Cu²⁺ ions bind to the phosphate groups of poly(I). At the Cu²⁺ concentration above 10⁻⁵ M, the interaction between the metal ions and the poly(I) bases, especially with C₆=O of inosine, occurs. This binding causes destabilisation of the polymer and the helicity degree decrease down to the transition into the coil conformation. The Cu²⁺ binding to poly(I) in the coiled conformation induces the formation of intermolecular bonds, that has an effect on the sharp increase of $[\eta]$ as well as on the great increase of the absorption band intensity C₆=O. The larger concentration of the Cu²⁺ leads to the polymer aggregation.

Key words: polyinosinic acid, Cu²⁺, intrinsic viscosity, IR spectroscopy, helicity degree, binding degree

MASS SPECTROMETRIC STUDY OF LIQUID SOLUTION OF AMINO ACID PROLINE IN ETHANOL AT TEMPERATURES BELOW 0°C

O.A. Boryak, M.V. Kosevich, V.S. Shelkovsky

Institute for Low Temperature Physics and Engineering, NAS of Ukraine, 47, Lenin Ave., Kharkov, 61164, Ukraine.

E-mail: boryak@ilt.kharkov.ua

A possibility of qualitative and semi-quantitative estimate of the composition of liquid solutions of organic and inorganic compounds in a cryoprotector solvent at temperatures as low as -130÷ -100°C by means of low temperature FAB/SIMS mass spectrometry is demonstrated on the example of solutions of amino acid proline and NaCl in ethanol. Method of deriving information on these solutions from analysis not only of molecular but of cluster ions as well is described. Ratio of ethanol to solute in the liquid eutectic is estimated as 8:1 for water and NaCl and up to 40:1 for proline. Continuous monitoring of changes in ion currents of various ions with temperature increase allowed to observe fine peculiarities of thawing process.

Key words: proline, ethanol, cryoprotector solution, low temperature mass spectrometry, secondary emission

THE CONFORMATIONAL STRUCTURE OF RIBOSE AND 2-DEOXYRIBOSE ISOLATED IN THE LOW TEMPERATURE INERT MATRIXES.

S.A. Krasnokutski, A.Yu. Ivanov, G.G. Sheina, Yu.P. Blagoi

Institute for Low Temperature Physics and Engineering of NAS of Ukraine., 61164 Kharkov, 47 Lenin Ave.

The conformational behaviour of ribose and 2-deoxyribose molecules has been investigated both matrix isolation spectroscopy and quantum chemical methods. FTIR matrix isolation spectra in the Ar and Ne matrix were recorded in the range 4000-450 cm^{-1} . The calculations of relative stability of different conformers are done by *ab initio* methods HF/3-21G(p) and HF/6-31G(d,p). The comparison of experimental and calculated IR spectra obtained by quantum chemical methods allow to determinate three conformers of 2'-deoxyribose which is fixed in matrix sample at the temperature 5-30 K. It is found that all OH groups in matrix isolated conformers are involved in intramolecular hydrogen bonding. The lowest border for the altitude of interconformational transfer (2,5kcal/mol) was determinated using annealing of matrix sample.

Key words: ribose, quantum chemical calculations, matrix isolation, FTIR spectroscopy.

CARMINOMYCIN INTERACTION WITH POLY (U) AND POLY (A) ON THE DATA OF THE POLARIZED FLUORESCENCE

N.N. Zhigalova, V.N. Zozulya¹, O.A. Ryazanova¹

Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov, 61077, Ukraine;

¹Institute for Low Temperature Physics and Engineering, NAS of Ukraine, 47 Lenin Ave., Kharkov, 61164, Ukraine; E-mail: zozulya@ilt.kharkov.ua

The interaction of anthracycline antibiotic carminomycin with synthetic polynucleotides: poly (A) and poly (U) at low ionic strength of solution is investigated by methods of absorption and polarized fluorescent spectroscopy. This dye forms two alternative types of complexes with single-chain polynucleotides such as which formation occurs at the expense of electrostatic interaction ligand aminosugar with phosphate groups of polymer. At small ratio of molar polymer to ligand concentrations (P/D) the cooperative binding with steking-associates of carminomycin chromophores among themselves dominates. At high values P/D associates break up and the complexes of ligand monomer with nucleic bases are formed. The thermodynamic parameters of two types of interaction of carminomycin with polynucleotides are appreciated: with nucleic bases and with phosphate groups of polymer.

Key words: carminomycin; polynucleotides; complex formation; polarised fluorescence.

SYMMETRY ANALYSIS OF GENETIC CODE AND DETERMINATIVE DEGREE

D. R. Duplij, S. A. Duplij

Department of Physics and Technology, Kharkov National University, Kharkov 61077, Ukraine

A three-dimensional model of the genetic vocabulary is proposed in terms of determinative degree, an introduced characteristic of nucleotide, which reflects absolute difference between purin and pirimidin bases in one DNA strand. In the framework of this model manifest symmetry and group properties are described. It is proposed to use the determinative degree of codons to analyse genetic texts, and to explain the biological sense of various functional regions of DNA.

Key words: genetic code, codon, kubic matrix, purin-pirimidin inversion, determinative degree, symmetry, group

ON A POSSIBILITY TO MONITOR THE VITAMIN D FORMATION PROCESSES USING SELECTIVE REFLECTION PROPERTIES OF CHOLESTERIC LIQUID CRYSTALS

O.V. Korzovska, I.P. Terenetskaya¹, L.N. Lisetski

Institute for Single Crystals NAS of Ukraine, 60 Lenin Ave., 61001 Kharkov, Ukraine; e-mail: lisetski@isc.kharkov.com

¹Institute of Physics NAS of Ukraine, 46 Nauki Ave., 03039 Kiev, Ukraine

For sterols of vitamin D group, temperature-dependent selective reflection spectra have been measured in the cholesteric matrix. It has been found experimentally that chiral molecules of vitamin D isomers significantly affect optical properties of cholesteric matrices. It has been shown that shifts of selective reflection peaks in the systems studied can be used for monitoring of vitamin D formation reactions induced by UV irradiation. Alongside with purely steroidal matrices based on cholesterol esters, an optimized composition with induced helical structure has been proposed, ensuring the absence of intrinsic absorption in the 250-300 nm range. The use of this matrix allows to simultaneously study both selective reflection and electronic spectra. The photoisomerization processes were shown to be affected by supramolecular ordering of the solvent. Possible use of the proposed approach for creation of biomimetic UV detectors is discussed.

Key words: liquid crystals, vitamin D, photoisomerization, UV irradiation, selective reflection spectra, electronic spectra.

PHYSICO-MATHEMATICAL ANALYSIS AND EXPERIMENTAL DETERMINATION OF THE DENSITY AND PROBABILITY DISTRIBUTION OF HUMAN DONOR AND CORD BLOOD BY SPHERICITY INDEX.

E.A. Gordienko, O.I. Gordienko, I.F. Kovalenko, Yu.E. Panina, A.A. Alekseev¹

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, 23 Pereyaslavska St, Kharkov, 61015, Ukraine;

¹Kharkov National University, 4 Svobody Sq., Kharkov, 61077, Ukraine

The function and the density of probability distribution by sphericity index of human donor and cord blood have been determined from experimental curves of osmotic fragility under temperatures of 37° C and 3° C.

Key words: human erythrocytes, small angle light scattering method, sphericity index.

STUDIES OF Ca^{2+} -TRANSPORTING SYSTEM OF SECRETORY CELLS EXOCRINE GLANDS USING CHLORTETRACYCLINE

V.V. Manko, T.V. Korol, M.Yu. Klevets, O.T. Demkiv

Ivan Franko Lviv National University; Institute of Ecology of the Carpathians, NAS of Ukraine

The functioning of Ca^{2+} -transport systems of cell membranes in tissues was studied with the method of registration of Ca^{2+} -chlortetracycline-complex fluorescent. We found influence of nifedipin and diltiazem on the quantity of membrane-bound Ca^{2+} in conditions of hyperpotassium depolarisation in salivary glands of *Chironomus plumosus* L. larvae. These results support that the potentialdependent calcium channels are present in the plasma membrane of investigated secretory cells. The stimulatory effect of caffeine on quantity of membrane-bound Ca^{2+} is determined by changes of the Ca^{2+} -pumps functional activity. It's supported by fact that quantity of membrane-bound Ca^{2+} decreases when caffeine act in the presence of butylhydroquinone. That is a result of Ca^{2+} release from intracellular stores through the caffeine(riandine)-sensitive channels and efflux by Na^+ - Ca^{2+} exchange system of plasma membrane.

Key words: secretory cells, exocrine glands, chlortetracycline, membrane-bound Ca^{2+} , potentialdependent calcium channels, caffeine(riandine)-sensitive calcium channels, Ca^{2+} -pump, Na^+ - Ca^{2+} -exchanger.

THE ROLE OF GLUTAMATE AND GABA RECEPTORS IN THE ELECTRICAL ACTIVITY REGULATION OF HYDRA OLIGACTIS PALLAS CELLS

I.O.Prots, R.V.Tyzio, D.I.Sanagursky

Chair of the Biophysics and Mathematical methods in Biology, Ivan Franco Lviv National University

The results of experimental monitoring of glutamate and gamma-aminobutyric acid (GABA) receptors availability on the freshwater hydra *Hydra oligactis* Pallas cells are represented in this work. The object of study permits to research on the cell level the role of these receptors in regulation of the electrical activity under the influence of the specific inhibitors. The electrical and physiological improvements of GABA and glutamate receptors availability on the *Hydra oligactis* Pallas cells are received. It is possible to confirm that GABA receptors participate in inhibition of electrical activity, AMPA and NMDA - in excitation processes.

Key words: Hydra, glutamate receptors, GABA receptors, microelectrode technique.

THE SIMULATION OF LASER INDUCED THERMOTHERAPY OF BRAIN TUMORS

Kononov O.V., Kononov M.V., Novoselets M.K., Paliy I.M.

Medical Radiophysics Department, School of Radiophysics, Shevchenko Kyiv National University, 6 Acad. Glushkov Ave., K.yiv 03127, Ukraine, e-mail: nmk@mail.univ.kiev.ua

The methods of treatment of tumoral formations by thermal influencing on tumor cells recently are actively elaborated. One of such methods is a laser thermotherapy - the thermal influencing, which is effective due to the absorption of laser beam energy during the irradiation of a tumor. Usually the tumor cells can be destroyed at some critical temperature, and the productivity of treatment depends on distribution of temperatures in a zone of intervention. Therefore, at clinical use of such methods there is a requirement of temperatures fields calculation both inside of tumor and in healthy ambient tissues. It is necessary for definition of effective tactics of treatment, where the maximum destruction of tumor cells is reached at minimum influencing on healthy tissues. It is possible to execute such calculation by the solution of a heat conduction equation for a model problem. The complexity of this calculation is in the relation of physical characteristics of biological tissues to temperature, and the necessity of registration of a considerable heat rejection due to blood turnover, that can be different for diseased and healthy tissues and results in spatial relation of model factors. Besides, the distribution of laser irradiation in an absorptive optical space results in nontrivial spatial relation of a source function of a thermal energy. Therefore it is necessary to apply the numerical methods to the solution of this task. It is the purpose of this paper to describe the numerical modelling and computer programming of brain tumor laser treatment, and to introduce the possibilities which become available with the use of designed program.

Key words: laser, thermotherapy, irradiation, diffusion, heat, light, coagulation.

INVESTIGATION OF THE SLOW KINETICS OF PHOTOEXCITATION AND RELAXATION IN THE REACTION CENTRES OF PHOTOSYNTHETIC BACTERIAS

Y.M.Barabash, N.M.Berezetskaya, M.T.Kapustina, V.N.Kharkyanen

Institute of Physics, NAS of Ukraine, Kyiv, 26 Nauki Ave.; e-mail: kv@ukma.kiev.ua

Optical absorbance of reaction centres of photosynthetic bacteria under prolonged excitation and activation by pulses under special protocol were experimentally investigated. The process of photoexciting electron transfer was theoretically described on the basis of selfregulation between electron flux and slow structure rearrangement of protein complex of macromolecule. The computer simulation of experimental results exhibit the good agreement with theoretical model. It was showed that the trivial process like appearance of additional redox-traps which capable of trapping electron for a long time cannot satisfactorily explain the experimental results.

Key words: reaction centres from *Rb.Shaeroides*, electron transport, electron-conformation interaction.

STATISTICAL SIMULATION OF CORRELATION DEPENDENCES OF TEXTURE PARAMETERS OF PARENCHYMATOUS ORGANS' ULTRASOUND IMAGES

M. K. Novoselets, S. P. Radchenko

Shevchenko Kyiv National University, 64 Volodymyrska St, Kyiv 01034, Ukraine, e-mail: nmk@mail.univ.kiev.ua, spr@mail.univ.kiev.ua

Theoretically, by mathematical simulation a behaviour of spatially distributed physical system with a non-linear feedback, that modelled parenchymatous organ, is investigated. The practical algorithm of simulation of statistical parameters distribution of a human parenchyma is developed by analysis of the numerical methods and indications for statistical models'

construction. In work the comparison of results of theoretical calculation with data which have received in time of practical researches of ultrasound thyroid gland images is carried out. Because of simulation results the practical recommendations for use of statistical texture parameters of ultrasound images in the diagnostic purposes and conclusions for refinement of a model are made.

Key words: spatially distributed system, statistical distribution, texture, ultrasonic introscopy, regulation, parenchyma, thyroid gland.

THE DEPENDENCE OF FIBRINOGEN HYDRATION FROM γ -IRRADIATION DOSE ON DATA OF MICROWAVE DIELECTRIC METHOD

O.A. Gorobchenko, O.T. Nikolov, V.P. Berest, S.V. Gatash

Kharkov National University, 4 Svobody Sq., 61077, Kharkov, Ukraine; e-mail: Vladimir.P.Berest@univer.kharkov.ua

The influence of γ -irradiation on structural changes of fibrinogen molecule by microwave dielectric method on frequency 9,2 GHz was investigated. The dependence of dielectric constant of water fibrinogen solutions from concentration and irradiation dose in dose range 5–200 Gy have been obtained. Protein hydration was calculated. It was found that structural transitions of fibrinogen molecule which accompanied by hydration change take place under γ -irradiation of protein solution with doses 10–15, 35, 50, 100, 140–150 Gy.

Key words: fibrinogen, γ -irradiation, hydration, structural changes.

MASS-SPECTROGRAPHY OF LOCAL RADIATION INJURIES OF SKIN ZONE

V. Moroz

Kharkov Institute of Medical Radiology, 82 Pushkinskaya St.; e-mail: root@moroz.kharkov.ua

With the purpose of adaptation of mass-spectrography research on structure of molecular fragments of skin the study on 157 patients with local radiation injuries are executed. Analysed comparability of pathology spectres, and also repeatability of spectres accordingly to localisation of tissues testing, patients age, sex etc. Received data are significative about practicability, with the purpose of the further realisation of works in this direction, division of analysed molecular fragments on three fractions. Accordingly, weight up to 200 m/e⁻, up to 400 m/e⁻ and up to 650 m/e⁻. The temperature's division at elimination precisely enough allowed to distinguish fragments up to 500 m/e⁻. Is established dependent from time, past after ending of radiation therapy and clinical type of radiation injury (ulcer and fibrosis), accumulation of separate molecular fragments. Most precisely it was shown according of superficial layers of skin.

Key words: radiation injury, radiation therapy, skin, mass-spectrography

DETERMINATION OF OPTIMAL CORRELATION OF THAWING RATES TO COOLING, THAT ALLOWS TO REALISE HIGH SURVIVAL STANDARD OF MAMMALIAN EMBRIOS.

L.V. Gorbunov, I.A. Morozova, L.N. Gerasimenko.

Kharkov Biotechnology Centre, p/o Kulinichi, Kharkov, Ukraine 312120, e-mail: cryo@animal.kharkov.ua

Technological way of temperature measuring based on decreasing of systematic errors, appearing during measuring, was developed. Absolute (relative) errors of temperature determination are less than 0,5°C (0,5%) in range 100 to 0°C and 1,3°C (0,6%) in range 0 to -200°C. An optimal correlation of thawing rates B_t to cooling B_c , was determined ($B_t/B_c \geq 1,5$). An observance of this correlation allows to avoid a recrystallisation during the thawing, that makes possible to increase survival standard of mouse embryos on 15,8% as compared with traditional methods of vitrification ($B_t/B_c = 0,8$).

Key words: survival, vitrification, mouse embryos, method of temperature measurement, error, calibration, thermocouple.

Підписано до друку 30.06.2000. Формат 60x84 ¹/₈. Умов. друк.
арк. 7,26. Облік.-вид. арк. 10,08. Тираж 200. Ціна договірна.

61077, Харків, пл. Свободи, 4, Харківський національний університет
ім. В.Н.Каразіна. Видавничий центр Харківського національного ун-ту.

ТОВ "Рейтинг", 61022, м. Харків, вул. Сумська, 37, тел. (0572) 470123