

БІОФІЗИКА СКЛАДНИХ СИСТЕМ

УДК 543.05:636.085.3/087.7

МОДЕЛЮВАННЯ ДИНАМІКИ БІОСИНТЕЗУ РИБОФЛАВІНУ ТА ЙОГО ПОХІДНИХ ДРІЖДЖАМИ ПРИ РІЗНИХ ВНУТРІШНІХ ПАРАМЕТРАХ СИСТЕМИ

А.Є. Цимбрик, Д.І. Санагурський

Кафедра біофізики та математичних методів в біології, Львівський національний університет імені І.Франка,
вул. Грушевського, 4, Львів 79005
e-mail: biolog@franko.lviv.ua
Надійшла до редакції 17 жовтня 2000 р.

Запропонована модель біосинтезу рибофлавіну і флавінових коферментів, що базується на експериментальних даних робіт по дослідженню метаболізму рибофлавіну у дріжджів. Модель враховує рівняння ферментативних реакцій і кінетичні параметри. Дана модель часових змін відтворює експериментально виміряні зміни концентрацій метаболітів на протязі росту клітин дріжджів *Pichia quilliermondii*. Тестом на реальність моделі є її здатність коректно передбачити ефекти змін умов середовища чи мутацій. Запропонована модель демонструє таку можливість. Результати показують, що модель враховує багато аспектів метаболізму *in vivo* і допомагає зрозуміти і оцінити деякі події, що мають місце в процесі росту клітин дріжджів.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: модель метаболізму, динаміка біосинтезу рибофлавіну.

Динамічна поведінка метаболічної системи є надзвичайно складною і тому найчастіше непрогнозована. Тому, поряд з методами молекулярної біології та біохімії, широко використовуються засоби моделювання, які дозволяють передбачати результати модифікації метаболізму зокрема. Розробляються нові, здатні до дослідження динаміки та прогнозування методи моделювання, що застосовуються для визначення метаболічних потоків, концентрацій та оцінки регуляторних властивостей систем [1-6].

Рибофлавін, вітамін B₂, є попередником флавінмононуклеотиду та флавінаденіндинуклеотиду – кофакторів для широкого класу ферментів метаболізму, має комерційну цінність як добавка в харчовій промисловості і кілька видів флавіногенних мікроорганізмів, зокрема деякі види дріжджів, використовуються в промисловості для виробництва рибофлавіну шляхом ферментації. З огляду на важливу роль даного метаболіту ми вважали за доцільне поряд з біохімічними [7-9] та генетичними дослідженнями [10-12] застосувати методологію комп'ютерного моделювання до дослідження динаміки метаболізму рибофлавіну.

Дана робота не претендує бути завершеною версією моделі метаболізму рибофлавіну у дріжджів. Ціль роботи швидше у тому, щоб привернути увагу до проблеми і показати яким чином модель може бути сконструйована на основі відомостей про регуляторні і кінетичні параметри системи (як в стаціонарному стані так і при заданих динамічних умовах). Результати моделювання в подальшому можуть бути використані для ініціювання і як вказівки в нових експериментальних дослідженнях (так званий експеримент на основі моделі), результати яких (в ідеалі) в свою чергу доповнять саму модель – типовий ітераційний цикл системної ідентифікації складних систем.

МЕТОДИ

Математичний опис метаболічної системи. Фундаментальними рівняннями для опису метаболічних систем є рівняння Кірхгофа, відомі як рівняння масового балансу:

$$\frac{dS_i}{dt} = \sum_{j=1}^n C_{i,j} v_j \quad i = 1, 2, \dots, n, \quad (1)$$

де S_i – концентрації метаболітів; v_j – швидкості реакцій, що каталізуються ферментами E_j ; $C_{i,j}$ – стехіометрична матриця, утворена малими цілими числами, переважно 1, -1, 0, і фактично містить більше нулів, оскільки більшість ферментів перетворює лише кілька метаболітів; у системі, що складається з n метаболітів та m ферментів, $C_{i,j}$ буде $n \times m$ матрицею.

Диференціальне рівняння (1) доповнюється кінетичними рівняннями ферментів:

$$v_j = v_j(S_1, \dots, S_n; P_1, \dots, P_m). \quad (2)$$

У загальному випадку v_j – це швидкість реакції на одиницю кількості j -го ферменту відносно до

Моделювання динаміки біосинтезу рибофлавіну та його похідних ...

одного з його продуктів (S_n). Тоді $C_{ij}v_j$ відповідно буде швидкістю реакції j -го ферменту для i -го метаболіту.

Підставивши вираз (2) у рівняння (1) отримуємо:

$$\frac{dS_i}{dt} = f_i(S_1, \dots, S_n; p_1, \dots, p_m) \quad i = 1, 2, \dots, n, \quad (3)$$

Концентрації метаболітів (S_i) і потоки (v_j) є системними змінними, які обчислюються за модельними рівняннями (1–3), кінетичні константи (p_k) відіграють роль параметрів, вони не визначаються в моделі, а беруться з експериментально чи аналітично отриманих кінетичних даних ізольованих ферментів.

Параметр p_k може набувати різного вигляду, наприклад, це може бути концентрація ферментів (E_j), максимальна активність (V_m), константи Міхаеліса-Ментен (K_m), константи інгібування (K_i), концентрації зовнішніх ефекторів, активаторів (A) чи інгібіторів (I) тощо.

Рівняння (3) формують систему залежних від параметрів звичайних диференціальних рівнянь першого порядку, що описує поведінку метаболічної системи. Функція f є нелінійною завдяки перебігу бі- та тримолекулярних реакцій у метаболічному ланцюгу перетворень і нелінійному характеру кінетичних рівнянь ферментів, тому, у більшості випадків, розв'язок такої системи рівнянь не може бути отриманий аналітичним шляхом, а потребує використання чисельних методів.

Стационарний стан системи визначається умовами, за яких часова похідна системи змінних дорівнює нулю, тобто

$$f(S; p) = 0. \quad (4)$$

Відповідно до основного визначення стаціонарності динамічних систем стаціонарний стан розглядається як стабільний, якщо після пертурбацій система повертається до вихідного стану. Якщо система повертається до стабільності при $t \rightarrow \infty$, то така система називається асимптотично стабільною [13].

Динамічні зміни. Для обчислення динамічних змін необхідно розв'язати систему диференціальних рівнянь (3) для заданих значень параметрів. Загалом часова залежність системних змінних визначається шляхом чисельного інтегрування концентрацій метаболітів чи потоків як функцій від часу.

Модельний експеримент проводився з використанням засобів Gerasi 3.1 [14;15] (програми MS Windows для моделювання стаціонарних станів і часової поведінки біохімічних реакцій). Кінетичні змінні та параметри, необхідні для розрахунків, взяті з доступних баз даних (INTERNET) і з літературних даних по проблемі дослідження біосинтезу рибофлавіну дріжджами.

МОДЕЛЬ

Сукупність реакцій, які беруть участь у метаболізмі флавінів у дріжджів і були покладені в основу моделі, приведено в Табл. 1 Пуринові попередники перетворюються у рибофлавін і далі у флавінові коферменти ФМН і ФАД, піддаються складному регуляторному впливу як зовнішніх, так і внутрішніх ефекторів [16-18]. Структура метаболічної системи та кінетика її ферментів описані відповідно до експериментальних даних [19-22]. На основі даних про кінетичні властивості досліджуваної системи складена система диференціальних рівнянь, описаних відповідно до рівнянь масового балансу (1):

$$\begin{aligned} \frac{dGTP}{dt} &= -v_{R1} \\ \frac{dX_1}{dt} &= v_{R1} - v_{R2} \\ \frac{dX_2}{dt} &= v_{R2} - v_{R3} \\ \frac{dX_3}{dt} &= v_{R3} - v_{R4} \\ \frac{dX_4}{dt} &= v_{R4} - v_{R6} + v_{R7} \\ \frac{dS_2}{dt} &= -v_{R5} \\ \frac{dX_5}{dt} &= v_{R5} - v_{R6} \\ \frac{dX_6}{dt} &= v_{R6} - v_{R7} \\ \frac{dRIB}{dt} &= 2 \cdot v_{R7} - v_{R8} \\ \frac{dFMN}{dt} &= v_{R8} - v_{R9} \\ \frac{dFAD}{dt} &= v_{R9} \end{aligned} \quad (5.1-5.11)$$

Враховуючи складність отриманої системи і жорсткі умови, яким повинна задовольняти система, щоб досягнути стаціонарності, значення кінетичних параметрів ферментативних реакцій підбрані довільно на основі аналізу зібраних експериментальних даних і таким чином, щоб відтворювати характер змін в часі концентрацій продуктів біосинтезу описаних в роботах Шавловського і співр. [23-24].

Таблиця 1

Опис ферментативних реакцій які приймають участь у метаболізмі рибофлавіну у дріжджів

Номер реакції	КФ	Назва ферменту	Схема реакції
R1	3.5.4.25	GTP-циклогідролаза ^a	$GTP + 3H_2O = HCOO^- + PP_i + 2,5\text{-діаміно-4-окси-6-рибозиламінопіримидин-5'-фосфат}$
R2	1.1.1.193	Редуктаза ^c	$2,5\text{-діаміно-4-окси-6-рибозиламінопіримидин-5'-фосфат} + NADPH = 2,5\text{-діаміно-4-окси-6-рибітил-амінопіримидин-5'-фосфат} + NADP^+$
R3	3.5.4.26	Дезаміназа ^b	$2,5\text{-діаміно-4-окси-6-рибітиламінопіримидин-5'-фосфат} + H_2O = 5\text{-аміно-2,4-диокси-6-рибітиламінопіримидин-5'-фосфат} + NH_3$
R4	3.1.3.-	Фосфатаза ^b	$5\text{-аміно-2,4-диокси-6-рибітиламінопіримидин-5'-фосфат} = 5\text{-аміно-2,4-диокси-6-рибітиламінопіримидин}$
R5	-----	3,4-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат синтаза ^b	$\text{Рибулозо-5-фосфат (S2)} = 3,4\text{-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат} + HCOOH$
R6	5.1.9	6,7-диметил-8-рибітиллюмазин-синтаза ^d	$5\text{-аміно-2,4-диокси-6-рибітиламінопіримидин} + 3,4\text{-дигідрокси-2-бутанон-4-фосфат} = 6,7\text{-диметил-8-рибітиллюмазин} + P_i$
R7	2.5.1.9	Рибофлавінсинтаза ^c	$2\text{ 6,7-диметил-8-рибітиллюмазин} = \text{Рибофлавін} + 5\text{-аміно-2,4-диокси-6-рибітиламінопіримидин}$
R8	2.7.1.26	Рибофлавінкіназа ^c	$\text{Рибофлавін (RIB)} + ATP = FMN + ADP$
R9	2.7.7.2	Ф:ФМН- аденілілтрансфераза ^c	$FMN + ATP = FAD + P_i$

Механізми дії наведених у таблиці ферментів описуються такими реакціями:

$$^a - v = V_s S / K_m (1 + I / K_i + S / K_m (1 + I / K_i))$$

$$^b - v = V_s / (K_m + S)$$

$$^c - v = V_f (AB - PQ / K_{eq}) / (AB(1 + P / K_{ip}) + K_{mb}(A + K_{ia}) + K_{mb}B + V_f / V_r K_{eq} (K_{mq} P (1 + A / K_{ia}) + Q (K_{mp} (1 + K_{mb} B / K_{ia} K_{mb}) + P (1 + B / K_{ib}))))$$

$$^d - v = V_f (AB - P / K_{eq}) / (AB + K_{mb}A + V_f / V_r K_{eq} (K_{mp} + P (1 + A / K_{ia})))$$

де V – максимальна швидкість реакції; S – концентрація субстрату реакції; I – концентрація інгібітору реакції; K_i – константа інгібування; K_m – концентрація субстрату, при якій $v = V/2$ для $I = 0$ (константа Міхаеліса); V_f – максимальна швидкість прямої реакції; V_r – максимальна швидкість зворотної реакції; K_{eq} – константа рівноваги; K_{mA} – константа Міхаеліса для першого субстрату; K_{mB} – константа Міхаеліса для другого субстрату; K_{mP} – константа Міхаеліса для першого продукту; K_{mQ} – константа Міхаеліса для другого продукту; K_{ia} – константа інгібування першим субстратом прямої реакції; K_{ib} – константа інгібування другим субстратом прямої реакції; K_{ip} – константа інгібування зворотної реакції.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

В цьому розділі описано кінетичну поведінку моделі отриману в результаті проведеного модельного експерименту, порівнюються результати моделювання з даними дослідження особливостей метаболізму рибофлавіну у дріжджів *Pichia guilliermondii* отриманими *in vivo*. Показано, що модель біосинтезу рибофлавіну і його похідних здатна відтворювати стан системи при різних заданих внутрішніх параметрах. Щоб дослідити відтворювальні можливості моделі, змінювали окремі параметри системи і проводили новий розрахунок системи рівнянь (5.1-5.11). Отримані результати порівнювали як з даними вихідної моделі, так і з експериментально отриманими даними. З метою аналізу впливу змін внутрішніх параметрів системи, вимірювали значення концентрацій метаболітів у кінцевій точці інтегрування. Для аналізу вибрана саме ця стадія, оскільки це критична точка, в якій можна виміряти значення концентрацій як продуктів біосинтезу, так і їх попередників.

В результаті чисельного інтегрування отримали динаміку накопичення продуктів біосинтезу – рибофлавіну та флавінових коферментів. Показано, що вміст флавінів поступово наростає з виходом на стаціонарний рівень, а концентрація флавінових нуклеотидів порівняно з такою рибофлавіну була значно меншою (рис.1а,1,2). Причому співвідношення рибофлавін/флавінові нуклеотиди на різних етапах збільшувалося до рівня в 5.9 разів на стаціонарній стадії, що узгоджується з експериментальними даними [23]. Отримані результати є подібними до описаних Шавловським і співр. [23] даних про накопичення флавінів в культуральній рідині і в клітинах при вирощуванні дріжджів *Pichia guilliermondii* на середовищі з високим вмістом заліза.

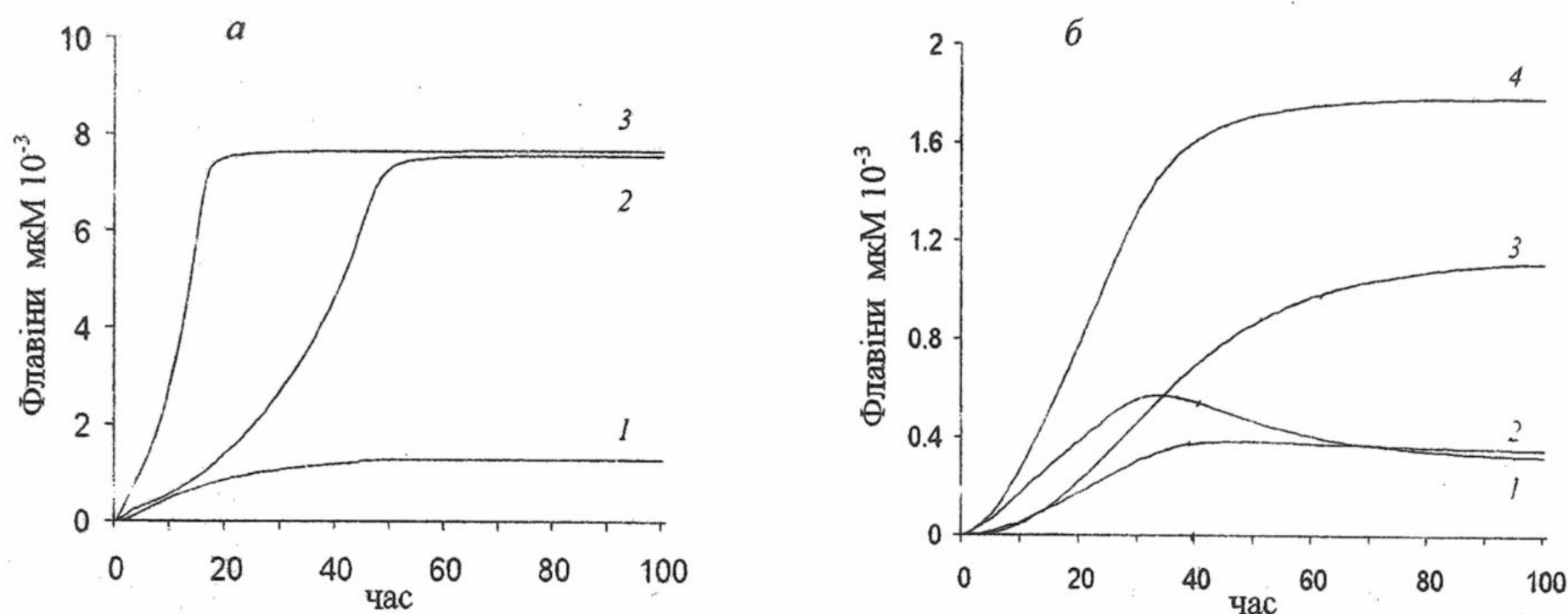


Рис.1 Динаміка накопичення флавінів в моделі при низьких значеннях максимальної швидкості реакції (V)
 а: 1 – флавінові нуклеотиди; 2 – рибофлавін; 3 – динаміка накопичення рибофлавіну при насиченні ферменту (R6) субстратом (S2)
 б: 1 – ФМН; 2 – рибофлавін; 3 – ФАД; 4 – сумарний вміст флавінів в клітині.

Показано, що динаміка утворення продуктів значною мірою залежить від доступності субстратів. Зокрема, значне накопичення рибофлавіну порівняно з флавіновими нуклеотидами в моделі обумовлено порівняно низькою концентрацією другого субстрату для рибофлавінкінази – АТФ. На Рис.1б представлені дані про вміст окремих флавінів отримані на моделі при підвищенні концентрації АТФ в 10 разів, які відповідають динаміці накопичення флавінів клітинами описаній в роботі [23], згідно з якими в фазі сповільненого росту (30-60 год.) вміст флавінів зростає головним чином за рахунок ФАД, кількість вільного рибофлавіну була найвищою на початку фази сповільненого росту, а перед початком стаціонарної фази значно зменшувалась. Також показано, що при насиченні ферменту 6,7-диметил-8-рибітіл्लомазинсинтаза (R6) субстратом, спостерігається значне зростання швидкості утворення продуктів біосинтезу, зокрема рибофлавіну (рис. 1а,3).

У дріжджів виявлено два механізми регуляції біосинтезу рибофлавіну: ретроінгібування за участю флавінів [7,17,26] і репресія на рівні транскрипції залізопротейном [16-18,20]. Ряд видів дріжджів при вирощуванні на середовищах з низьким вмістом заліза здійснюють надсинтез рибофлавіну. Показано, що при цьому у дріжджів відбувається дерепресія ряду ферментів у метаболічному ланцюгу біосинтезу рибофлавіну [20]. Тому, нам було цікаво дослідити поведінку моделі при різних значеннях активності ферментів. З цією метою ми промодельовали зміни активності, змінюючи значення V в кінетичних рівняннях ферментів, і спостерігали за змінами, що при цьому відбувалися. Виявили, що із збільшенням значення V в 10 і більше разів при незмінних значеннях концентрації субстратів, досягається незначне підвищення концентрації синтезованого рибофлавіну. Тоді як у поєднанні із зростанням концентрації ГТФ – субстрату для першої реакції біосинтезу, спостерігається значне зростання швидкості утворення і концентрації рибофлавіну, на фоні незначного накопичення кінцевих продуктів біосинтезу – ФМН і ФАД (рис.2).

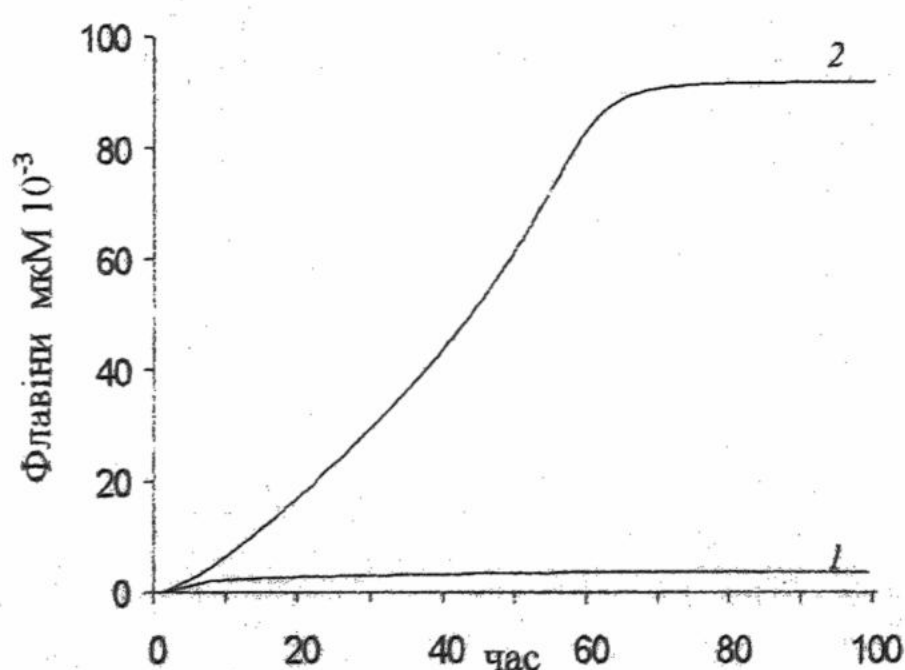


Рис.2 Динаміка накопичення флавінів в моделі при високих значеннях максимальної швидкості реакції (V):
 1 – флавінові нуклеотиди; 2 – рибофлавін.

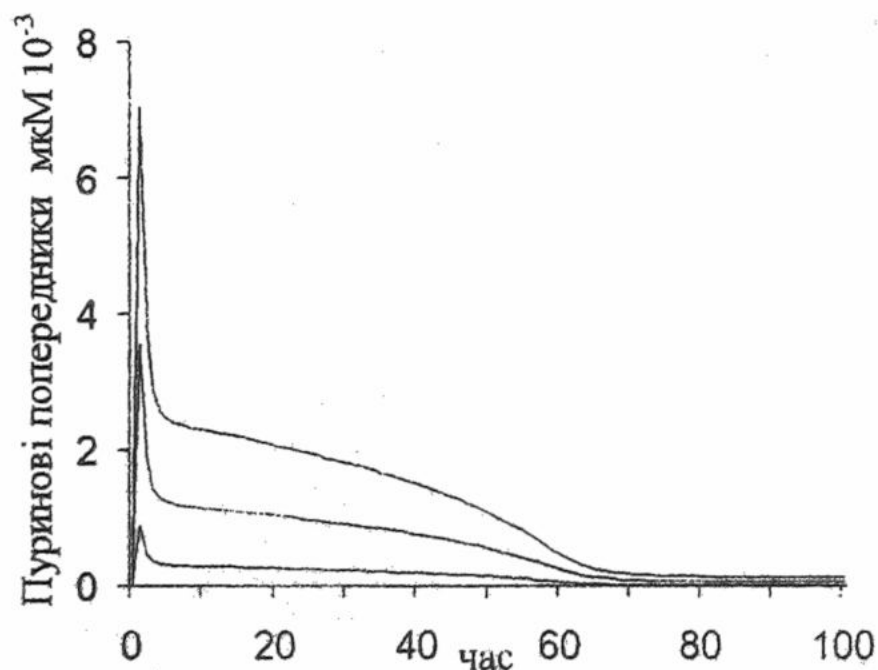


Рис.3 Динаміка утворення проміжних метаболітів біосинтезу рибофлавіну

Отримані результати добре узгоджуються з описаними в роботах [23,25] і підтверджують той факт, що ферменти флавіногенезу ймовірно не повністю насичені субстратами [26], через конкуренцію з іншими реакціями обміну за попередник – гуанілові нуклеотиди. Крім того показано, що при наявності достатньої кількості субстрату із зростанням максимальної швидкості (V) реакції R1, R6, R7 спостерігається значне накопичення одного з продуктів метаболізму, рибофлавіну, тоді як утворення кінцевих продуктів, ФМН та ФАД, лімітовано концентрацією другого субстрату рибофлавінкіназної реакції – АТФ. Також, на моделі дослідили динаміку перебігу проміжних реакцій метаболізму рибофлавіну (рис.4), що неможливо досягнути в експериментах *in vivo* чи *in vitro* через надзвичайну лабільність піримідинових попередників рибофлавіну [26].

ВИСНОВКИ

Беручи до уваги важливу роль флавінових нуклеотидів як в метаболізмі клітин мікроорганізмів так і при застосуванні в терапевтичних цілях, видаються актуальними подальші дослідження молекулярних основ регуляції флавіногенезу. Результати представлені в даній роботі є свідченням того, що комп'ютерне моделювання може бути одним із шляхів подальшого просування в цьому напрямку. І хоча теоретичні дискусії і математичне моделювання інколи і декому видаються віддаленими від реальності, проте аналіз існуючих в цій області робіт дозволяє стверджувати, що дослідження контролю метаболізму засобами комп'ютерного моделювання стає необхідним компонентом в розумінні того як метаболічна система себе поводить, що в свою чергу може бути використано для модифікації її поведінки в конкретних медичних та біотехнологічних цілях.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Cornish-Bowden A., Eisenthal R // New Beer in an Old Bottle: Eduard Buchner. and the Growth of Biochemical Knowledge. University of Valencia. 1997. P.215-224.
2. Hatzimanikatis V., Emmerling H., Sauer U., Baily J.E // Biotechnol. Bioeng. 1998. Vol.58. P.154-161.
3. Schauer M., Heinrich R., Rapoport S.M. // Acta biol. Med. Germ. 1981. B.40. S.1659-1697.
4. Varner J., Ramkrishna D. // Current Opinion in Biotechnology. 1999. Vol.10. №2. P.146-150.
5. Vaseghi S., Baumeister A., Rizzi M., Reuss M. // Metab. Engineering. 1999. Vol.1. P.128-140.
6. Mendes P., Kell D. Computer Simulation of Biochemical Kinetics /BioThermo-Kinetics of the living cell (eds. H.V.Westerhoff, J.L.Snoep, F.E.Sluse, J.E.Wijker, and B.K.Kholodenko), BioTermoKinetics Press, Amsterdam. 1996. P.254-257.
7. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М. // Укр. биохим. журн. 1985. Т.57. №4. С.104-112.
8. Логвиненко Е.М., Трач В.М., Кащенко В.Е., Закальский Л.Е., Колтун А.В., Шавловский Г.М. //Биохимия.- 1977.Т.42, №9.С.1649-1654.
9. Логвиненко Е.М. Шавловский Г.М. Конторская Н.Ю. // Генетика. 1987. Т.23. №9. С.1699-1701.
10. Шавловский Г.М., Бабяк Л.Я., Сибирный А.А., Логвиненко Е.М.//Генетика. 1985. Т.21. №3. С.368-374.
11. Garcia-Ramirez J.J., Santos M.A., Revuelta // J. Biol. Chem. 1995. Vol.270. №40. P.23801-23807.
12. Liauta-Teglivets O., Hasslacher M., Boretskii I., Rohlwein S.D., Shavlovskii G.M. // Yeast. 1995. Vol. 11. №10. P.945-952.
13. Рубин А.Б. Биофизика: в 2 кн.: Учеб. для биол. спец.вузов. Кн.1 Теоретическая биофизика. М.1997.
14. Mendes P. // Trends Biochem. Sci. 1997. Vol.22. P.361-363.
15. Mendes P. // Comput. Applic. Biosci. 1993. Vol.9. P.563-571.
16. Логвиненко Е.М., Шавловская Г.Л., Закальский А.Е., Заходько Н.В.//Биохимия.1982.Т.47.№1.С.28-32.
17. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Трач В.М., Колтун Л.В. Об участии механизмов ретроингибирования и репрессии в регуляции флавиногенеза у дрожжей / Витамины. К.: Наукова думка, 1976.т.7.С.99-104.
18. Шавловский Г.М., Кащенко В.Е., Колтун Л.В., Логвиненко Е.М., Закальский А.Е. //Микробиология. 1977.Т.46. №3.С.578-579.
19. Логвиненко Е.М., Шавловский Г.М., Закальский А.Е. // Микробиология.1979.Т.48. №4.С.755-758.
20. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М. // Прикл. биох. и микр. 1988. Т.24. №4. С. 435-447.
21. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Сибирный А.А., Федорович Д.В., Закальский А.Е. //Микробиология.1981.Т.50. № 6.С.1008-1011.
22. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Закальский А.Е // Биохимия.1983.48. № 5.С.837-843.
23. Шавловский Г.М., Струговщикова Л.Н // Микробиология-1969.Т.38. № 1.С.5-12.
24. Шавловский Г.М., Струговщикова Л.Н // Микробиология.1968.Т.37. № 3.С.389-394.
25. Шавловский Г.М., Кузнецова Р.А., Логвиненко Е.Н., Струговщикова Л.Н. О роли метаболизма гуаниловых соединений в сверхсинтезе рибофлавина у дрожжей / Витамины. К.:Наукова думка, 1974. С.112-120.
26. Шавловский Г.М., Логвиненко Е.М., Струговщикова Л.И., Кащенко В.Е // Укр. биохим. журн. 1975.Т.47. №5.С.649-660.

ДЛЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.3

FTIR SPECTROSCOPY STUDIES OF DNA FROM LOW-DOSE IRRADIATED TISSUES

G.I. Dovbeshko¹, E.B. Kruglova², O.P. Paschuk¹, M.Alesina³, N.Ya. Karpenko³,
A.Mysnyk⁴, M. Novoselets⁴

1-Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Prospekt Nauki, 46, Kyiv-03039, Ukraine 2-Institute of Radiophysics and Electronics of National Academy of Sciences of Ukraine, 12, Akademika Proskury str., 310085, Kharkov-85, Ukraine; 3-Chernobyl Scientific and Technical for International Research, 6, Shkolnaya str., Chernobyl, 255650, Ukraine; 4- Kiev Taras Shevchenko University, Prospect Glushkova 6, Kyiv-252127.

e-mail: gd@iop.kiev.ua

Received 26 May 2000.

FTIR spectra of DNA isolated from low-dose irradiated epididymis of rats from Chernobyl NPP Exclusion Zone have been investigated in the 500-4000 cm⁻¹. The total absorbed doses were as follows: after 12 months irradiation (12-month rats) - 5.7 and 57 cGy, and after 4 months irradiation (4-month rats) - 0.7, 2 and 25 cGy. Only slight random changes have been observed in the DNA from 4-month rats. More changes have been observed in 12-month rats. Deconvolution and curve decomposition of complex bands as well as an algorithm of neural nets has been applied to the evaluation of the DNA spectra. The probability of the right recognition the irradiated DNA spectra was more than 80%. No correlation of the total absorbed doses with the changes in the spectra has been observed. A modification of bases and sugars as well as a rearrangement of H-bond nets, which can be connected with arising changes in the spatial structure of the DNA, takes place in the irradiated DNA. The FTIR data are in the accordance with the data of UV melting curves obtained on the same samples.

KEYWORDS: DNA molecule, FTIR spectra, UV melting curves, Chernobyl NPP Exclusion Zone, low-dose combined irradiation, Kohonen neural net algorithm.

A study of genome damages and modification of the structure of the DNA molecules isolated from the low-dose irradiated tissue is a subject of great interest. That is due to the fact that a lot of people are living now under the action of permanent radiation in the territories polluted with radionuclides after Chernobyl disaster [1]. Genetic abnormalities lead to different diseases, including tumours. Last years, optical and vibration spectroscopy, along with traditional methods, is widely used in the genetic investigations for the analysis of nucleic acid. Earlier we have applied optical methods for observation of damages in DNA induced by the low-dose irradiation [2] and vibration spectroscopy for diagnostics of brain tumour nucleic acids at different stages of malignancy [3,4]. High sensitivity of vibration spectroscopy to DNA conformational state was demonstrated earlier by the observation of drastic differences in the FTIR spectra of the DNA from breast cancer tissues [5] and the manifestation of the creation of new forms of DNA under the exposition of fishes to environmental chemicals [6]. In this paper we present the FTIR spectroscopy data and their comparison with UV melting curves for DNA isolated from irradiated epididymis of rats, which have been exposed to irradiation in the Chernobyl NPP Exclusion Zone during a long period of time (from 4 months to 12 months).

MATERIALS AND METHODS

DNA preparation and experimental methods

DNA was isolated from frozen epididymis of Wistar rats according to [7]. The rats lived under the permanent influence of external radiation 40-60 μ R per hour in Chernobyl NPP Exclusion Zone. The animals took food and drink (from 4th block of Chernobyl NPP) with radionuclides Sr⁹⁰ and Cs¹³⁷⁺¹³⁴ contamination in different levels. As it was shown in [8], an accumulation of radionuclides in certain organs and tissues leads to an increase of irradiation doses inside the living organisms. The DNA isolated from epididymis of the experimental rats of the same ages, which lived in the Kiev and got pure water and feed, was taken as the reference DNA. Protein and RNA impurity content of the DNA were less than 1%. Gel-electrophoresis data did not show low-molecular fragments in the DNA under study. The total absorbed radiation doses were as follows: after 12 months irradiation (12-month rats) - 5.7 and 57 cGy, and after 4 months irradiation (4-month rats) - 0.7, 2 and 25 cGy. Reference and irradiated DNA for all samples were taken from group of 5-7 rats and averaged.

The DNA has been cast on the transparent in the IR region CaF₂ substrate for FTIR measurement and dried liophilically. All samples of DNA kept in the closed boxes with P₂O₅ water adsorbent. FTIR spectra have been registered with IFS-48 Bruker instrument in the 500 - 4000 cm⁻¹. UV melting curves were obtained with the

spectrophotometer Specord M40 and quartz thermostable cuvette of 10 mm length. A solution of the reference and the irradiated DNA and its mixture with anomalous nucleosides (NUC) below referred to as ligands were investigated in the 35° - 70°C temperature region. The cytosine arabinoside (Ara-C) and 6-aza cytidine (6AZC) of concentration $C=(6-10) \times 10^{-5} \text{ M}$ of ligand and $C_p=(7-10) \times 10^{-5} \text{ M}$ of DNA as recalculated to phosphate moles, were used. The DNA and ligande concentration were estimated with the following extinction coefficients: $\alpha_{260}(\text{P})=6400 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for DNA, $\alpha_{270}=9440 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for Ara-C and $\alpha_{265}=9690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for 6AZC. We have obtained that the absorption spectra of the NUC in 0.01 ISSC buffer solution (ISSC contain 0.15 M NaCl + 0.015 M citrate Na, pH 7.2) did not change in the 35° - 70°C range. So, we could monitor the changes in DNA-nucleoside mixture absorption without any corrections for absorption of free ligand.

We estimated the ΔT_m , which is equal to the difference between T_m and T_m^0 and characterises the changes in melting temperature of DNA-ligand mixture (T_m), in comparison with the melting temperature of free DNA (T_m^0). The T_m and T_m^0 are chosen as points which correspond to $\theta=0.5$, where $(1-\theta)$ is a portion of broken pairs in double DNA helix. Here $(1-\theta)$ is determined as $(A_T - A_{\min}) / (A_{\max} - A_{\min})$, where A_T - absorbance at current temperature, $A_{\max}$ and $A_{\min}$ - higher and lesser absorbance of the DNA or DNA-NUC mixture. FTIR and UV spectra were registered on the same DNA samples.

FTIR spectra evaluation

After the registration of FTIR spectra we made a deconvolution of the bands with Opus-2.0 program. This option performs a Fourier-self-deconvolution of the spectrum. The aim of this operation is to enhance the apparent resolution of a spectrum or decrease the width of all lines contributing to the investigated spectral range. Positions of the bands have been estimated with the use of the method of the second derivative. The bands have been assigned to the certain molecular groups in RNA and DNA according to [9-16]. For the estimation of halfwidth, integral intensity and real frequencies of overlapping bands, the complex spectral bands in the regions 3800-2300 cm^{-1} (region of the OH-NH-CH stretching vibrations), 1800-1550 cm^{-1} (region of base vibrations), and 1350-1000 cm^{-1} (region of phosphate vibration) were decomposed with the option «Curve fit» of Opus 2.2. Shapes of different spectral bands under decomposition have been approximated with sums of Lorenz and Gauss functions. For statistical evolution of DNA spectra we used the algorithm of neural nets.

Algorithm of neural nets

We know about great variability of living organisms, that is why we tried to apply the algorithm of neural nets to isolate the changes in the spectra due to irradiation or cancer transformation from the random insignificant changes. We used Kohonen algorithm with gradient learning [17] to estimate spectra differences and recognition efficiency. The Kohonen algorithm is based on a rule of competitive training for a neural network, for which a portion of excessive information about the arrangement of neurones in a target layer is entered. For this purpose neurones of a target layer are ordered, forming a one-dimensional or two-dimensional grid.

It was offered to enter in the original algorithm the information concerning initial initialisation of neural weights, or to conduct the so-called gradient initialisation. It is meant to initialise neural weights separately for every component of an entry vector in a precisely established range with a certain digitisation factor, reducing (or increasing) each new value by this digitisation factor.

After network initialisation, the spectra of samples of different nature were presented on network input, pair by pair - reference and irradiated spectra, as two classes of input objects. Due to the ideology of the network the result of processing of given spectra was obtained on the network as Kohonen maps, and then the efficiency parameters were calculated as indicated above.

A feature map of the size of 1000x1000 neurons for spectral samples was built and trained under chosen learning algorithm. For the further analysis we have calculated the following parameters of spectra recognition - efficiency, sensitivity and probability of right recognition. Sensitivity is the probability of reference spectra recognition and it defines the deviation between given reference spectra and average reference spectra. Formally, from probability theory, the sensitivity could be defined as a sum:

$$Se = \frac{\sum_i P_{s_i}}{\sum_i P_{s_i} + \sum_i N_{s_i}},$$

where P_{s_i} is the probability of right recognition on the given set of points (spectra samples) of initial spectra and N_{s_i} is the probability of false recognition of initial data. In the case of contiguous and differentiable data the sum could be written as integral. For our needs of finding a deviation of two reference spectra we have to use:

$$Dse = 1 - Se$$

The specificity could be defined as the probability of non-reference spectra recognition and it shows the deviation between average and given non-reference spectra.

$$Sp = \frac{\sum_i Nh_i}{\sum_i Ph_i + \sum_i Nh_i},$$

where Nh_i - is the probability of right recognition on the given set of points (spectra samples) of initial spectra (non-reference) and Ph_i is the probability of false recognition of initial data. In the case of contiguous and differentiable data the sum could be written as integral. For our needs of finding a deviation of two non-reference spectra we have to use:

$$Dpe = 1 - Sp$$

Parameter of probability of right recognition (comes from medicine and recognition method efficiency assessment) could be named as cumulative efficiency of right recognition and it defines deviation between reference and defective spectra. In the simplest form it could be defined as:

$$De = \sum (Ps_i + Nh_i) / P_i,$$

where P_i - is summed probability for given set of spectra.

The above-mentioned parameters comes from probability theory and medical diagnostics and have to perform the recognition of some data, in our case, it is FTIR spectral data.

RESULTS AND DISCUSSION

FTIR data

We based on the statement (hypothesis), that the changes ($1 - 4 \text{ cm}^{-1}$) in the position of the bands of the same molecular groups of DNA molecules reflect rather normal variability of the biological samples than the influence of the irradiation. That is why we pay more attention to the integral intensities of the molecular groups than the frequency positions, and try to use correlation data obtained by different methods for the same DNA samples.

Complex band at $3800-2300 \text{ cm}^{-1}$ which corresponds to stretching vibrations of OH, NH and CH groups (Fig. 1, a, Fig. 2, a and Tables 1 and 2, as well as the vibration bands of bases, sugars and phosphates group (Fig. 1, b, Fig. 2, b and Tables 1 and 2) in the $1800-1000 \text{ cm}^{-1}$ region, have been investigated for all DNA samples. We have not registered drastic changes in the samples under study. However some changes in the distribution of the integral intensities of the stretching OH, NH and CH vibrations as well as in their frequencies and changes in the integral intensity and frequencies of the PO_2^- , C=O, C=N stretching vibrations and C-H and NH deformation vibration have been observed.

DNA from 4-month rats

For all irradiated DNA samples we have registered an increase in the integral intensities of the bands of the CH vibrations relative to those of the OH vibrations (Fig. 1 a, b, c, Tabl. 1 (the empty cells in the Tables 1 and 2 mean that the data had not been measured). The changes in the fine structure of CH bands and in the intensity and frequencies of the NH bands for 4-month rats have been observed, too. So, for the sample of 4-month rats irradiated by 25 cGy, a maximum of NH band is 3327 cm^{-1} (integral intensity $I=3.78$), for the sample of 2 cGy dose it is 3329 cm^{-1} ($I=3.18$) and for 0.7 cGy dose it is 3330 cm^{-1} ($I=3.49$). So, the contribution of asymmetrical NH is greater for 25 cGy DNA than for other samples, the same is observed for the symmetrical NH vibrations. In its turn, the contribution of OH near 3406 became less in 25 cGy DNA. We have not observed the same tendency for OH vibration close to $3327 - 3225 \text{ cm}^{-1}$. We think that this is due to the fact that we have not taken into consideration a possible Fermi resonance of NH vibration in this region. We have observed the increase of NH intensity ($I=2.28$) at 2754 cm^{-1} in 25 cGy sample in comparison with DNA irradiated with 0.7 cGy ($I=1.94$) and DNA irradiated with 2 cGy ($I=1.94$). The same tendency was observed for NH intensity at 2831 cm^{-1} ($I=1.02$) of 25 cGy, compared with the 2 cGy at 2826 cm^{-1} ($I=1.08$) and for 0.7 cGy at 2823 cm^{-1} ($I=0.8$).

For CH stretching modes in the sample with 25 cGy, the band positions in the DNA are as follows: 2955 cm^{-1} (2948 cm^{-1} in 2cGy and 2952 cm^{-1} in 0.7 cGy); 2923 cm^{-1} (2917 cm^{-1} in 2cGy and 2921 cm^{-1} in 0.7 cGy); band at $2848-2850 \text{ cm}^{-1}$ (practically remains unchanged for all samples) and 2889 cm^{-1} (2886 cm^{-1} in 2 cGy and 2889 cm^{-1} in 0.7 cGy). Usually in the DNA samples we could not resolve so much CH bands in this region. These changes correlate with the changes in the frequencies of NH and CH in-plane deformation vibration near 1415 cm^{-1} (Fig. 1, b)

and arising of a new band at 669.6 cm^{-1} in the sample irradiated with 25 cGy (Fig. 1, c). It seems to be connected with possible changes of sugar conformations due to rotation of the bases relative to glycoside bonds [14]. Taking into account these facts and increasing in the intensities of CH bands in the $2800\text{--}3000\text{ cm}^{-1}$ region (Fig. 1, a), we could suppose that some modification of the bases or sugars appeared in DNA.

In the $1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ region, changes in C=O vibrations of thymine, guanine and cytosine (near 1715 cm^{-1} , 1682 cm^{-1} and 1653 cm^{-1}); adenine (1602 cm^{-1}), ring vibrations of all bases, and in-plane CH vibration at 1414 cm^{-1} have been observed (Fig. 1, b, Tabl. 1). The intensity of adenine vibrations at 1602 cm^{-1} increases in the irradiated DNA.

Table 1. Frequencies of vibration bands (in cm^{-1}) for DNA isolated from 4-month epididymis of low dose gamma-irradiated rats.

0.7 cGy			2 cGy			25 cGy			Assignment
Wave number cm^{-1}	Integral intensity	Width	Wave number cm^{-1}	Integral intensity	Width	Wave Number cm^{-1}	Integral intensity	Width	
3577	1.20	110.2	3573	1.39	119.7	3581	1.39	110.2	Str. O-H
3471	3.02	140.7	3462	2.40	146.5	3471	3.05	154.1	Str. O-H
3406	6.69	185.7	3404	4.27	179.1	3406	6.28	187.9	Str. O-H asym.
3330	3.49	119.8	3329	3.18	117.7	3327	3.78	122.1	Str. N-H asym.
3227	3.77	145.2	3214	4.13	153.8	3225	4.19	149.3	Str. O-H sym.
3156	3.75	147.1	3157	3.73	174.3	3158	3.85	151.5	Str. N-H sym.
3077	2.27	117.4	3079	1.85	116.6	3079	2.87	125.9	C-H ring
2999	1.01	83.2	2998	1.06	93.2	3010	0.93	80.1	C-H ring
2952	0.87	46.1	2948	0.82	55.6	2955	1.15	57.2	Str. C-H
2921	0.68	33.4	2917	0.58	33.2	2923	0.33	38.8	Str. C-H
2889	0.58	48.5	2886	0.21	32.4	2889	0.52	45.6	Str. C-H
2850	0.20	20.4	2850	0.18	22.7	2848	0.04	17.2	Str. C-H
2823	0.80	127.4	2826	1.08	167.9	2831	1.02	176.3	Str. N-H
2753	1.94	244.9	2761	1.98	286.4	2754	2.28	295.0	Str. N-H
1717	0.21	18.2	1716	0.13	19.5	1715	0.59	27.1	C=O Thymine, B-form.
1704	1.88	36.7	1702	1.73	38.3	1701	1.56	37.1	C=O Thymine, A-form.
1682	1.91	42.5	1682	2.09	45.0	1682	1.84	43.1	N-H Thymine, C ₂ =O Guanine
1652	2.47	36.1	1651	2.34	40.3	1653	1.96	41.9	C ₂ =O Cytosine
1634	1.45	39.9	1634	0.93	32.4	1637	1.51	40.1	C=N Adenine, C=C, C=O Thymine, N-H Guanine
1602	0.68	27.5	1602	1.40	32.8	1602	1.39	33.0	C=N Cytosine, Adenine
1575	0.49	26.5	1574	0.34	19.9	1575	0.32	22.5	C=N Adenine
1289	0.14	21.6	1289	0.17	22.2	1290	0.11	22.2	Cytosine
1275	0.01	8.4	1276	0.02	9.7	1276	0.06	19.9	N-H Thymine
1239	3.64	61.3	1239	3.60	57.4	1239	4.06	62.7	Str. PO ₂ asym. (PI)
1188	0.10	49.7	1189	0.21	50.0	1188	0.23	64.6	Deoxyribose
1108	-	-	1106	-	-	1108	-	-	Str. PO ₂ sym. (PII)
1098	-	-	1095	-	-	1087	-	-	Str. PO ₂ sym. (PII)
1059	-	-	1059	-	-	1055	-	-	Str. C-O Deoxyribose
1010	-	-	1010	-	-	1009	-	-	Str. C-O Deoxyribose
962	-	-	962	-	-	962	-	-	C-O Deoxyribose, C-C

FTIR spectroscopy studies of DNA from low-dose irradiated tissues

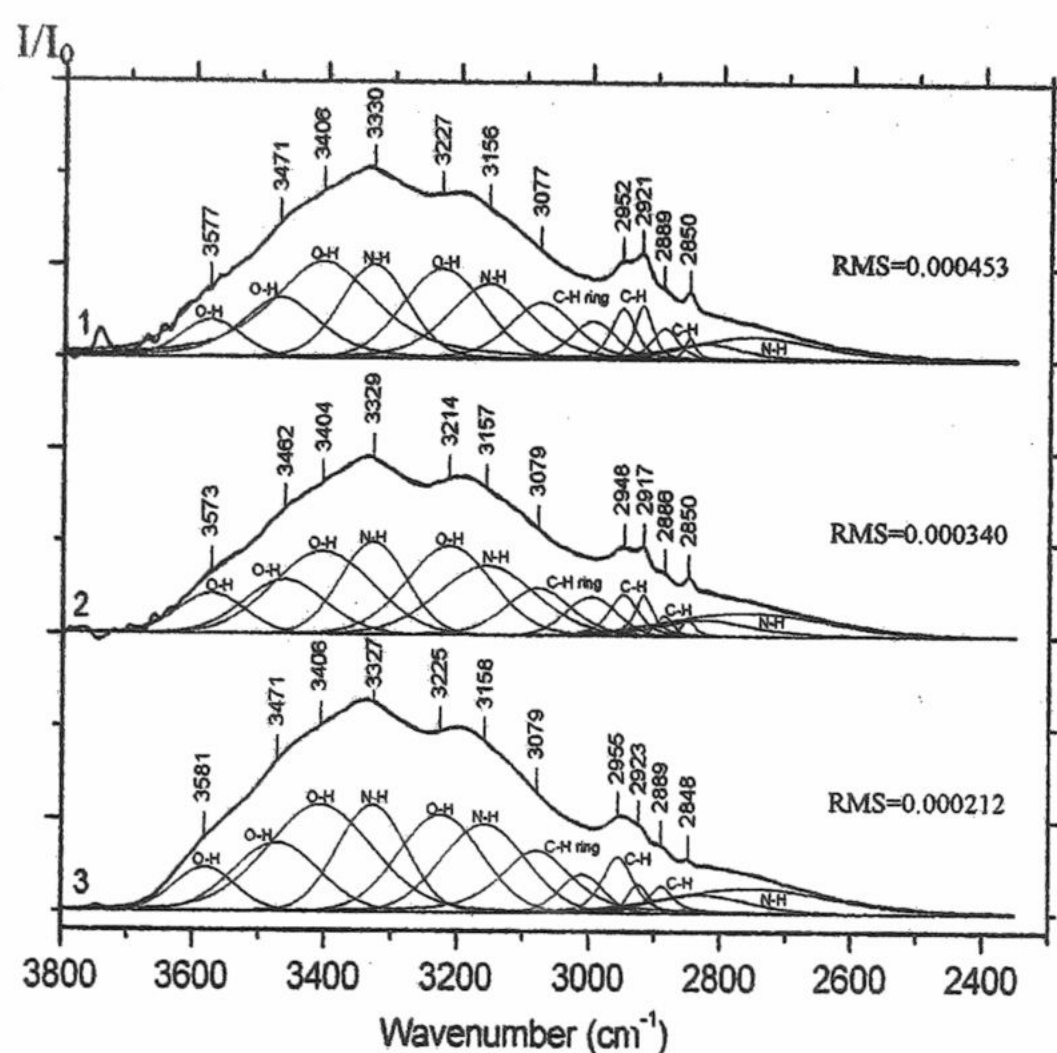


Fig. 1, a

FTIR spectra of the DNA (on the CaF_2) from 4-month rats in the $3800\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ region. Total absorbed doses: 1-0.7cGy, 2-2cGy, 3-25cGy. (Here and in all Figs. RMS is residual root of mean square error under the decomposition of the band).

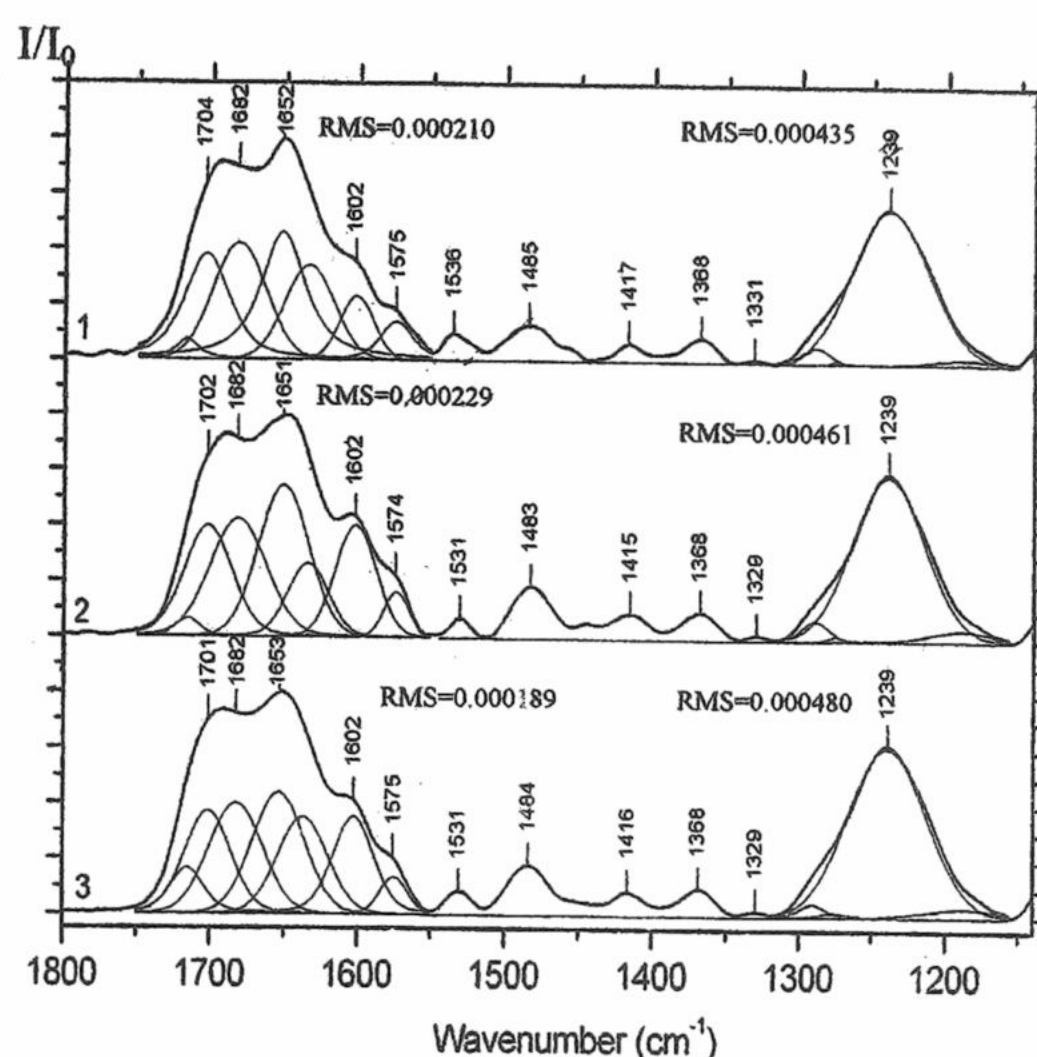


Fig. 1, b

FTIR spectra of the DNA (on the CaF_2) from 4-month rats in the $1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ region. Total absorbed doses: 1-0.7cGy, 2-2cGy, 3-25cGy.

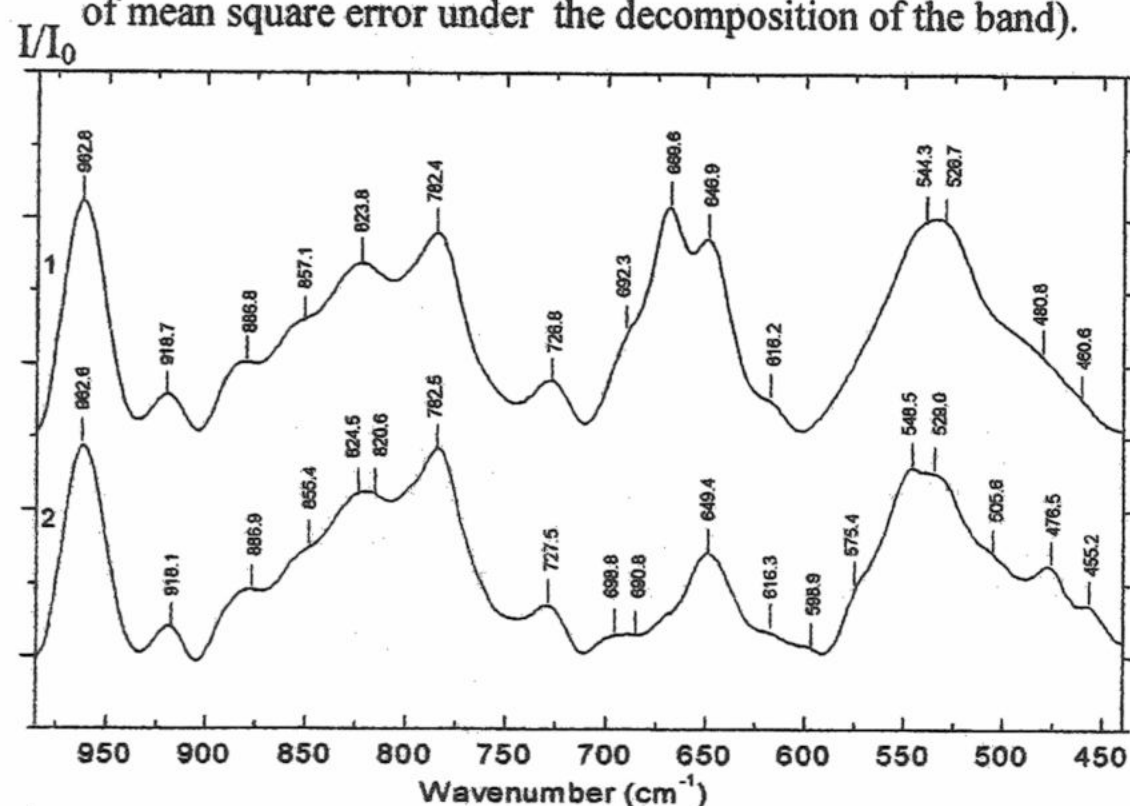


Fig.1 (c)

FTIR spectra of the free DNA (without substrate) from 4-month rats in the $1000\text{--}450\text{ cm}^{-1}$ region. Total absorbed doses: 1-25cGy, 2-0.7cGy

The band intensity of the C=O vibration of thymine, guanine and cytosine have a tendency to be changed in the irradiated samples. The contribution of C=O thymine at 1715 cm^{-1} (0.59) that characterise the B-form became greater for 25 cGy DNA than for other samples - in the 2 cGy - $I=0.13$, for 0.7 cGy - $I=0.21$, and the contribution of C=O thymine at 1701 cm^{-1} ($I=1.56$) (A-form) become less than for 2 cGy DNA ($I=1.73$) and 0.7 cGy ($I=1.88$). It could be explained by the fact that in the irradiated samples new H-bonded C=O bonds can arise, or old ones can break. No changes are observed in the Phosphate I vibrations. Some changes have been observed in the fine structure of Phosphate II vibration, and more changes occur in the position of this band lower the 1090 cm^{-1} . So, one can suppose that we observe the initial changes in the structure of irradiated DNA. It is possible that they have random and reversible character as well as they could be restored by the reparative mechanisms of the cells.

DNA from 12-month rats

In the DNA from 12-month rats we have observed similar changes with more pronounced character that in the DNA from 4-month rats, excluding a region of the CH stretching and deformational vibrations (Fig. 2), where the changes are more pronounced for DNA from 4-month rats. In the $3800\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ range for the DNA from the rats from Chernobyl zone we have observed the greatest changes. The spectra for the reference and irradiated DNA with decomposition are presented in Fig. 2 a, b and the assignment of vibration to the molecular groups is given in the Tabl. 2. For all irradiated DNA samples, we have registered an increase in the intensities of the bands in the region of CH vibrations. Namely, the sum of integral intensities of the CH bands in the reference DNA ($2850, 2886, 2918, 2953\text{ cm}^{-1}$) is less than in the DNA sample irradiated with 5.7 cGy ($2850, 2890, 2919, 2951\text{ cm}^{-1}$) or in the sample irradiated with 57 cGy ($2850, 2887, 2918, 2947\text{ cm}^{-1}$). All these sums were normalised by the total integral intensity

of the OH-NH-CH vibration complex band (Fig. 2, a, Tabl. 2). Using the decomposition, we come to the following results. In the reference DNA, the intensities of stretching asymmetrical OH bond at the 3396 cm^{-1} [15] are greater than those for NH stretching vibration at 3330 cm^{-1} . In the irradiated DNA, the contribution of NH bond at 3327 cm^{-1} [18] for 5.7 cGy and for 57 cGy DNA became greater and the contribution of the above mention OH band became less than in the irradiated samples. In the irradiated DNA, the contribution of high frequency OH bands ($3500 - 3600\text{ cm}^{-1}$) increases also. The increase of intensity and low-frequency shift of the band near 2769 cm^{-1} (reference sample) assigned to NH vibration, to new positions- 2727 cm^{-1} for 5.7 cGy and 2731 cm^{-1} for 57 cGy was also observed in the irradiated samples. All above mentioned OH and NH bands belong to H-bonded OH and NH bands. So, in the irradiated DNA we have observed the decrease of the intensity of strongly H-bonded OH at 3410 cm^{-1} and increase of both weakly H-bonded OH (at 3499 cm^{-1} and 3482 cm^{-1}) and both weakly (at 3327 and 3166 cm^{-1}) and strongly (at 2727 cm^{-1} and 2731 cm^{-1}) H-bonded NH. The same tendency, namely, the decrease of the strongly H-bonded OH at 3406 cm^{-1} and increase of strongly H-bonded NH at 3300 cm^{-1} took place in the 4-month rats.

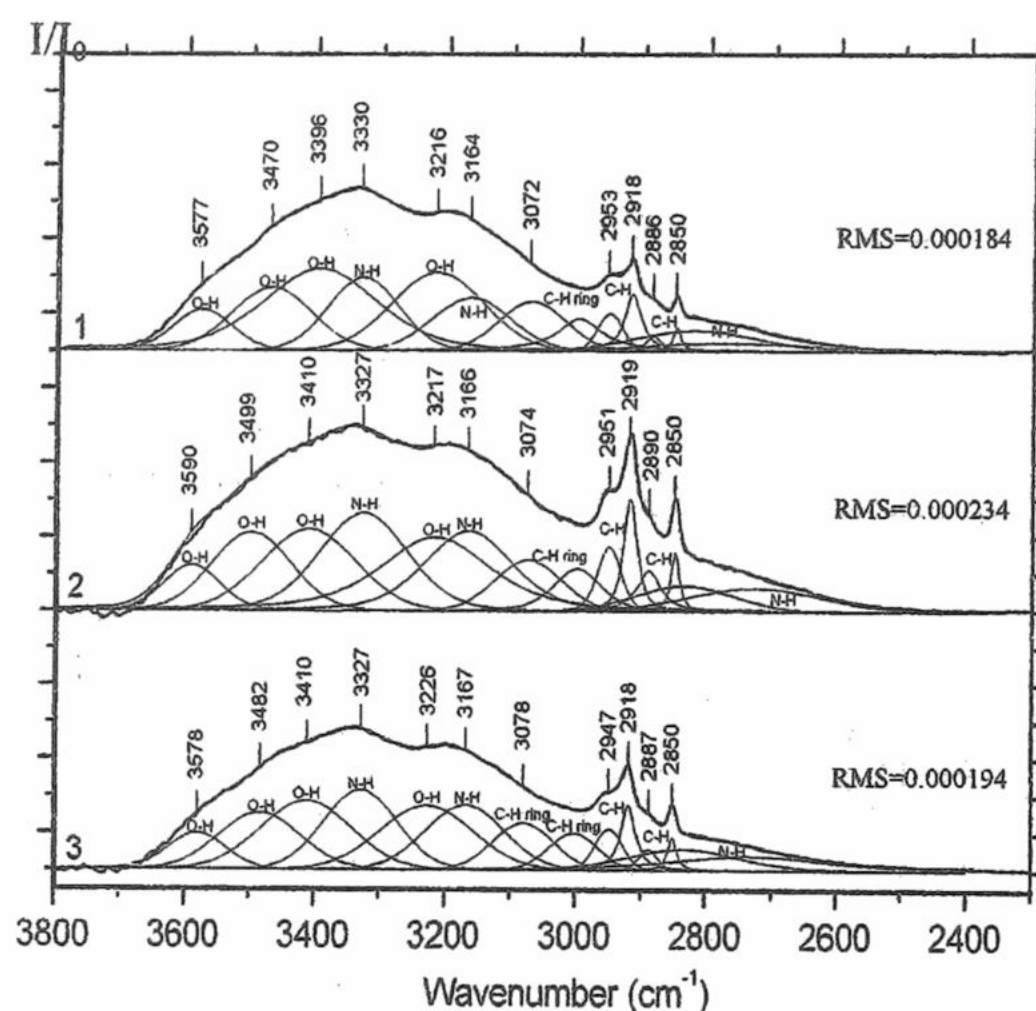


Fig. 2, a

FTIR spectra of the DNA (on the CaF_2) from 12-month rats in the $3800\text{--}2400\text{ cm}^{-1}$ region. Total absorbed doses: 1-reference sample, 2-5.7cGy, 3-57cGy.

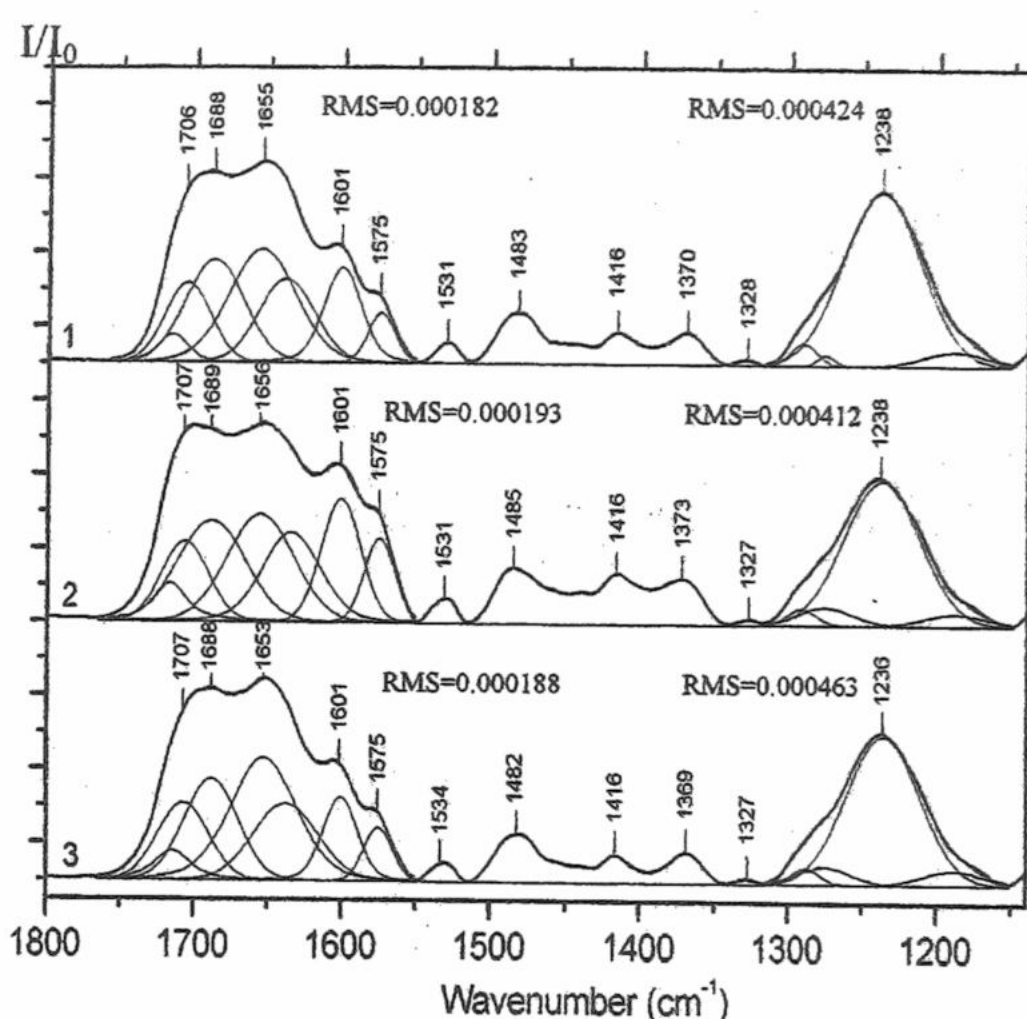


Fig. 2, b

FTIR spectra of the DNA (on the CaF_2) from 12-month rats in the $1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ region. Total absorbed doses: 1-reference sample, 2-5.7cGy, 3- 57cGy.

In the $1800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ region, changes in the C=O vibrations of thymine, guanine and cytosine, as well as C=N, C=C, NH ring and non-ring bands of all bases (near 1716 cm^{-1} , 1706 cm^{-1} , 1655 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 1575 cm^{-1}) have been observed (Fig. 2, a, Tabl. 2). The band intensity of the C=O vibration of thymine at 1716 cm^{-1} (B-form stacking) has a tendency to be increased in the irradiated samples. The intensity of the bands at 1655 cm^{-1} , 1639 cm^{-1} , 1601 cm^{-1} , 1575 cm^{-1} are increased in the 57 cGy irradiated DNA. This fact could be considered as disruption of stacking of bases or protonation of bases [19]. This could be explained by the fact that in the irradiated samples new H-bonded C=O bonds could arise, or old ones could disappear. This means, that new type of stacking could be formed under the irradiation.

Other important feature of the spectra of DNA from 12-month rats as compared with those from 4-month rats is that there are changes in the symmetrical and asymmetrical PO_2^- vibrations (Tabl. 2). We have registered 2 cm^{-1} low frequency shift in the DNA from 12-month irradiated rats for asymmetrical PO_2^- vibration and $5\text{--}6\text{ cm}^{-1}$ shift for symmetrical PO_2^- vibration. As in 12-month DNA, we have observed the increase of N-H of thymine at 1276 cm^{-1} (A-form) from $I=0.04$ in the reference DNA to $0.22\text{--}0.23$ in the 5.7 and 57 cGy samples. So, they probably manifest the initial changes in the tertiary and secondary structure of DNA.

FTIR spectroscopy studies of DNA from low-dose irradiated tissues

Table 2. Frequencies of vibration bands (in cm^{-1}) for DNA isolated from 12-month epididymis of low dose gamma-irradiated rats.

Reference			5.7 cGy			57 cGy			Assignment
Wave number cm^{-1}	Integral intensity	Width	Wave number cm^{-1}	Integral intensity	Width	Wave Number cm^{-1}	Integral intensity	Width	
3577	1.26	107.5	3590	1.20	103.5	3578	1.24	105.9	Str. O-H
3470	2.60	144.8	3499	2.88	144.0	3482	2.71	147.0	Str. O-H
3396	5.53	207.0	3410	3.56	170.7	3410	3.67	164.3	Str. O-H asym.
3329	2.67	128.1	3327	4.29	159.5	3327	3.45	133.1	Str. N-H asym.
3216	3.71	166.9	3217	4.73	197.8	3226	3.49	168.3	Str. O-H sym.
3164	2.14	141.7	3166	3.72	158.7	3167	2.98	141.9	Str. N-H sym.
3072	1.70	121.5	3075	1.58	121.6	3078	1.65	108.8	C-H ring
2999	1.13	83.1	3000	1.15	86.8	3001	1.07	89.3	C-H ring
2953	0.49	46.0	2951	0.80	43.2	2947	0.68	50.4	Str. C-H
2918	0.73	30.4	2919	0.97	24.9	2918	0.82	26.2	Str. C-H
2886	0.12	28.7	2890	0.67	43.5	2887	0.23	34.8	Str. C-H
2850	0.15	15.2	2850	0.34	15.6	2850	0.26	16.4	Str. C-H
2821	1.29	224.8	2836	1.16	177.6	2834	1.51	199.6	Str. N-H
2769	0.70	309.5	2727	1.42	240.3	2731	1.77	288.3	Str. N-H
1716	0.22	23.8	1717	0.41	25.8	1714	0.32	29.2	C=O Thymine, B-form.
1706	0.82	36.1	1707	0.87	37.3	1707	0.89	40.2	C=O Thymine, A-form.
1687	1.40	46.4	1689	1.60	54.0	1688	1.27	42.6	N-H Thymine, C ₂ =O Guanine
1655	1.80	53.5	1656	1.67	53.7	1653	2.05	52.8	C ₂ =O Cytosine
1639	1.07	44.6	1635	1.29	46.3	1638	1.14	51.6	C=N Adenine, C=C, C=O Thymine, N-H Guanine
1601	0.90	29.6	1601	1.12	31.4	1601	0.72	27.3	C=N Cytosine, Adenine
1575	0.31	21.4	1575	0.59	24.2	1575	0.35	22.4	C=N Adenine
1291	0.14	214	1292	0.12	24.0	1288	0.11	23.6	Cytosine
1276	0.04	13.9	1276	0.23	44.2	1276	0.22	42.8	N-H Thymine.
1238	3.04	61.4	1238	2.51	60.2	1236	2.46	57.6	Str. PO ₂ ⁻ asym., (P I)
1188	0.21	49.1	1188	0.18	49.3	1188	0.21	48.8	Deoxyribose
1105	-	-	1113	-	-	1109	-	-	Str. PO ₂ ⁻ sym. (P II)
1094	-	-	1100	-	-	1099	-	-	Str. PO ₂ ⁻ sym. (P II)
1057	-	-	1056	-	-	1060	-	-	Str. C-O Deoxyribose
1011	-	-	1009	-	-	1010	-	-	Str. C-O Deoxyribose
964	-	-	961	-	-	966	-	-	C-O Deoxyribose, C-C

We could not find direct connection between all observed changes in the DNA structure and the increase of the total absorbed doses, however we can say that the spectral changes in the irradiated DNA are more pronounced for 12-month samples with 57 cGy. So, duration of the irradiation is important factor of influence together with applied doses. Our FTIR data demonstrate the spectral manifestation, which are connected with H-bonded OH, NH and CO-groups and lead to the rearrangement of the H-network.

Neural net recognition of FTIR spectra of DNA.

The results of evaluation of FTIR spectra of DNA for 12-and 4-month rats, and determination of sensitivity, specificity and probability of right recognition for these spectra are given in Fig. 3 a, b. As one can see on Fig. 3, a and Fig. 3, b, the probability of right recognition for all samples is more than 0.86, sensitivity (for reference spectra) is more than 0.91 and specificity (for irradiated spectra) is more than 0.84. In general case, the recognition for DNA reference spectra is greater than those for the irradiated DNA, and the recognition for the spectra from 12-month rats

4-month rat DNA spectra

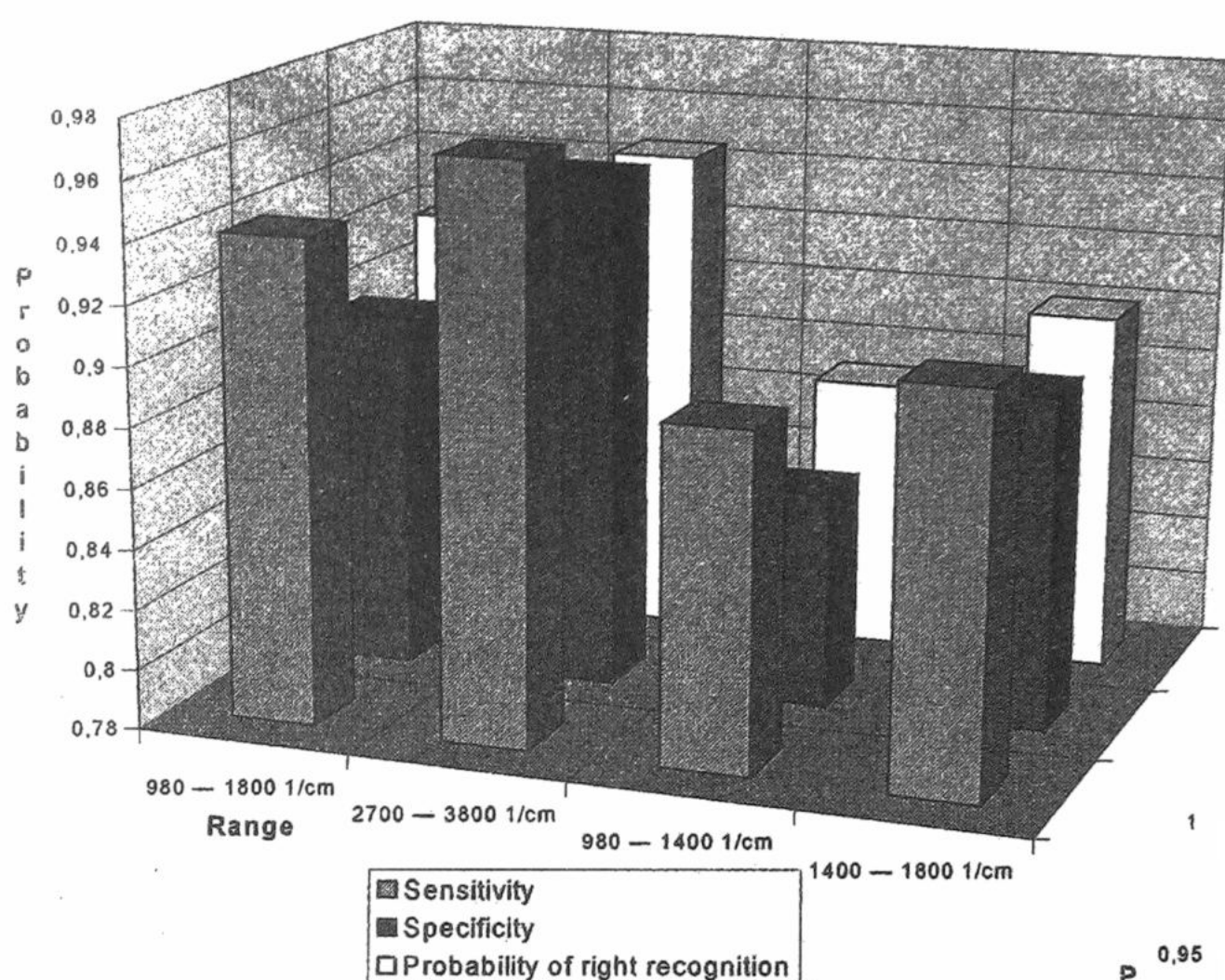
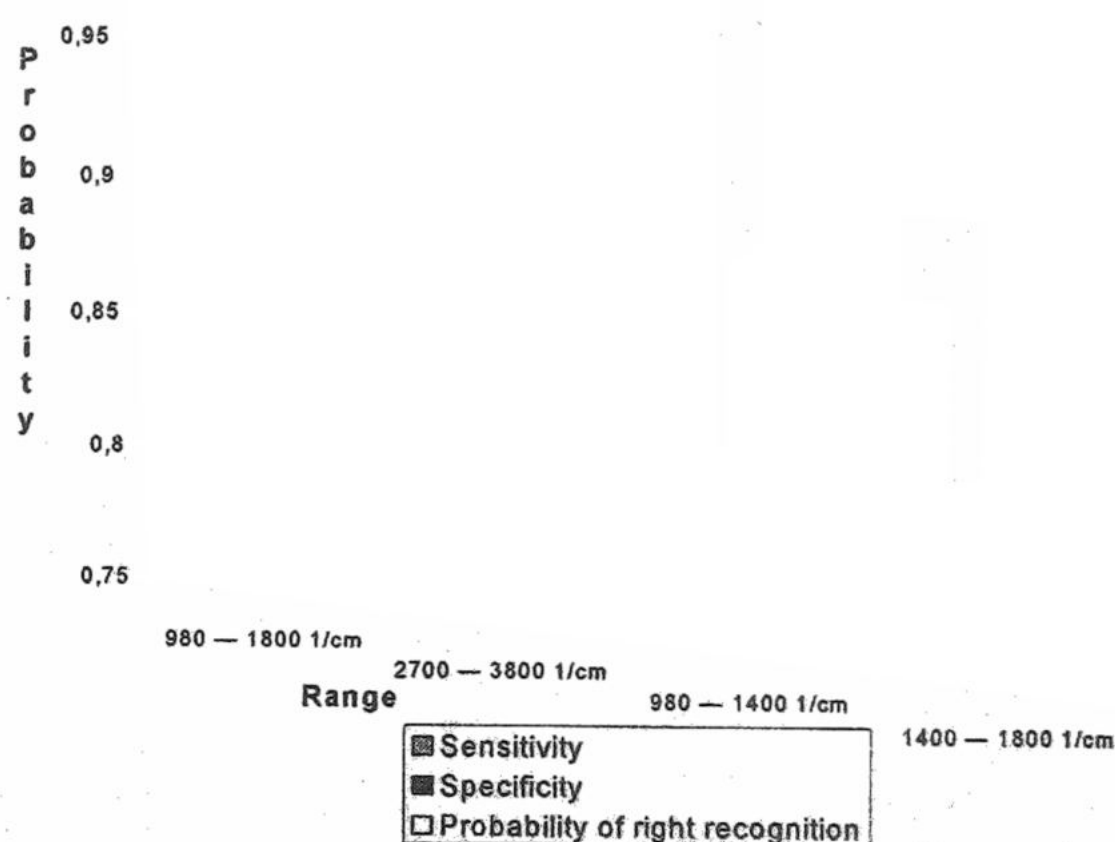


Fig. 3. Sensitivity, specificity and probability of right recognition for FTIR spectra of the DNA, estimated with Kohonen neural net algorithm for 4-month and 12-month rats.

12-month rat DNA spectra



is better than for those for 4-month rats. It could be explained by the fact that the variability in the irradiated DNA increases in the comparison with the reference DNA, and the variability in the DNA from 4-month rats is greater than those for DNA from 12-month rats. We have obtained different probability and specificity in different spectral ranges. We observed the best recognition in the 2700-3800 cm^{-1} region, and not good recognition in the 980-1400 cm^{-1} . The last fact is probably due to the limitation of transmittance by CaF_2 substrate lower 1000 cm^{-1} , and this situation does not reflect the real recognition of DNA of this spectral region. In the case, when we use more wide range 980-1800 cm^{-1} , the parameters of recognition increase. Good recognition is observed in the 980-1800 cm^{-1} region for all samples. So, we can determine the probability of right recognition for the reference and the irradiated DNA spectra with Kohonen neural net algorithm with gradient learning and use for this purpose the 2700-3800 and 980-1400 cm^{-1} spectral range.

Water in DNA films

Using the methods applied in [12], we estimated the number of water molecules per 1 nucleotide of DNA. For the DNA from 4-month rats it is as follows: 0.7 and 2 cGy samples – 4.6 H_2O molecules per nucleotide, and in 25 cGy sample – 4.8 H_2O . For DNA from 12-month rats, it is 5.36 molecules per nucleotide in the non-irradiated samples and in the irradiated samples – 4.2 H_2O molecules in the 5.7 cGy sample and 4.1 H_2O in the 57 cGy sample. So, in the irradiated samples, the number of water molecules has a tendency to be less than in reference ones. One could suppose that in the irradiated molecules of DNA, some of the sites of binding, which earlier were occupied by water molecules, now are occupied with other active groups. Usually water molecules prefer to couple with sugars so any decrease in their numbers mean that the sugar conformation seems to change. The starting changes in the spectra below 1000 cm^{-1} (Fig. 1, c) for the DNA from 4-month rats show this. This supposition is also in agreement with the data obtained on the melting curves of DNA in UV region in the presence of active nucleosides.

UV melting data

The data on melting curves of DNA and its mixtures with biologically active nucleosides showed that melting curves and T_m for the free reference DNA differ very slightly from melting curves of the reference DNA in a mixture with the nucleosides (ΔT less than 0.5°). The displacement of melting curves of irradiated DNA with nucleoside mixtures relatively to melting curve of free irradiated DNA to the region at high temperatures ($\Delta T=2-5^\circ$) is observed.

FTIR spectroscopy studies of DNA from low-dose irradiated tissues

These changes can be explained by greater accessibility of old or appearance of new bounding sites, for example, as a result of modification of the bases or conformational changes in the DNA molecules. Because of this, the bounding of the ligands with the irradiated molecules seems to be increased [2]. We have registered that 6AZC is more sensitive to changes in the structure of DNA molecules in comparison with Ara-C, which expressed in the greater values of ΔT_m at the same concentrations of DNA and ligand [20]. For 4-month DNA even maximal damages of the irradiation dose of 25 cGy reflect themselves in melting curves less than those (5,7 cGy dose) for 12-month DNA. As it was told earlier, in FTIR-spectra of DNA samples from 12-month rats, the tendency of structural changes in bases and sugarphosphate backbone is more pronounced. This fact, probably, is the main reason for observed differences in melting of DNA-NUC mixtures.

Thus, it can be concluded, that the comparison analysis of melting curves of free DNA and their mixture with Ara-C and 6AZC allows to find differences in conformation state of DNA molecules, from cells, that were subjected to action of prolonged irradiation of low doses. The changes in melting curves correlate to changes in infrared spectra of observed samples and one could conclude about initial modification in spatial structure of DNA molecules and redistribution of hydrogen bonds net.

CONCLUSION

These data of a preliminary character showed that some changes in the structure of the DNA isolated from low-dose gamma-irradiated samples have been observed for both 4 month and 12 month rats with FTIR and UV spectra. Only slight random changes on initial stage have been observed in the DNA from 4-month rats. More changes have been observed in 12-month rats, which can be connected with arising changes in the spatial structure of the DNA. No correlation between the total absorbed dose and the changes in the spectra has been observed. The modification of bases and sugars as well as a rearrangement of H-bond nets in the irradiated DNA seems to take place. Comparison analysis of UV melting curves of free irradiated DNA and its mixture with NUC allows one to find differences in the conformation state of DNA under the prolonged irradiation of low doses. The algorithm of neural nets has been applied for the evaluation of FTIR data. The probability of right recognition of all spectra under study was more than 80%.

Acknowledgements

This work was supported in part by Grant for Fundamental Research from National Committee of Science and Technology of Ukraine N24/656.

REFERENCES

1. Borisova V.V., Voevodina T.M., Fedorova F.V. et al., // *Biological Effects Under the Prolonged Action of Radionuclides*. Moscow, Energoizdat, 1988.
2. Kruglova E.B., Krutko N.A., Krasnitskaya A. A. // *Biophysical Bulletin of Kharkov University*. 1998. V. 422(2). P. 100 (Rus).
3. Dovbeshko G.I., Gridina N.Ya., // *Biophysical Bulletin of Kharkov University*. 1999. V. 438(3). P. 65 (Rus).
4. Dovbeshko G.I., Gridina N.Ya., in: *Spectroscopy of Biological molecules: Modern trends*. Ed.P. Carmona, R. Navarro, Hernanz, Kluwer Ac.Publ. Dordrecht-Boston-London, 1997. P. 451.
5. Malins D.C., Polissar N.L., Nishikida K., et al., // *Cancer*. 1995. V. 75. P. 503.
6. Malins D.C., Polissar N.L., Gunselman S.J., // *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 1997. V. 94. P.3611.
7. Chomczynski P., Sacchi H., // *Annal.Biochem*. 1987. V. 162. P. 156.
8. Serkiz Ya.I., Lipska A.I., Pinchuk L.B., et al., // *Radiobiology* 1991. V. 31. P. 629 (Rus.).
9. Baret J. F., Carbone G. P., Penon P., // *Biopolimers*. 1978. V. 17. P. 2319.
10. Taillandier E., Liquier J., and Taboury J.A. in: R. J. H. Clarck, R. E. Hester (Eds), *Advances in Infrared and Raman Spectroscopy*. Wiley Heyden, 1985. P. 65.
11. Schrader B., *Infrared and Raman Spectroscopy*. Weinheim-New York-Basel-Cambridge-Tokio, 1995. P. 765.
12. Shie M., *The Study of Conformations of Free and Intrafagic DNA with Infrared Absorption Spectra in the Region of Sugarphosphate Backbone Vibrations*. Thesis, Pushchino, Moscow, Institute of Biophysics, AN USSR, 1977. P. 22.
13. Blagoi Yu.P., Kornilova S.V., Leont'ev V.S., et al., // *Biophysics* 1994. V. 39.4. P. 637 (Rus).
14. Kornilova S.V., Kapinos L.E., Tomkova A., // *Biophysics*. 1994. V. 39. P. 423 (Rus).
15. Falk M., Hartman K. Jr., R.C. Lord, // *J.Amer.Chem.Soc*. 1963. V. 85. P. 387.
16. Belokur Ye.L., Dovbeshko G.I., Litvinov G.S., // *J.Mol.Structure*. 1992. V. 267. P. 61.
17. Muller B., Reinhardt J., Strikland M.T., *Neural Networks: An Introduction*. NY.: Springer, 1995. P. 256.
18. Parker F.S. *Application of Infrared Spectroscopy in Biochemistry, Biology and Medicines*. New York. Plenum Press, 1971. P. 425
19. Tajmir-Riahi H.A., Neault J.F., Naoui M., // *FEBS Letters*. 1995. V. 370. P. 105.
20. Kruglova E.B., Dovbeshko G.I., Krutko N.A., Paschuk O.P., Karpenko N.A., Alesina M.Yu., Krasnitskaya A. A // *Biophysical Bulletin of Kharkov University*. 1999. V. 450 (2). P. 92 (Rus).

ДІЯ ФІЗИЧНИХ ФАКТОРІВ НА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

УДК 577.125.33:57.043:57.017.6

ВЛИЯНИЕ ОСТРОГО ОХЛАЖДЕНИЯ НА СВОБОДНОРАДИКАЛЬНОЕ
ОКИСЛЕНИЕ ЛИПИДОВ В ОРГАНАХ МОЛОДЫХ И СТАРЫХ КРЫС

Ю.В. Никитченко, С.Е. Овсянников

*Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина, 61077, г. Харьков, пл. Свободы, 4
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61015, г. Харьков, ул. Переяславская, 15*

Поступила в редакцию 20 октября 2000 г.

На крысах линии Вистар 3-х и 24-месячного возраста изучено влияние острого охлаждения организма до состояния глубокой гипотермии на интенсивность хемилюминесценции и скорость накопления малонового диальдегида в гомогенатах печени, сердца и головного мозга. Показано, что к 3-му и 24-му часу постхолодового периода имеет место активация свободнорадикального окисления липидов во всех исследованных органах животных обеих возрастных групп. Установлена жесткая корреляция между результатами, полученными двумя независимыми методами. Полученные данные исследования о более выраженной активации перекисного окисления липидов у старых животных свидетельствуют о настоящей необходимости учета возрастного аспекта при разработке способов и средств лечения холодового повреждения организма.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: свободнорадикальное окисление липидов, острое охлаждение, возраст.

В ранее проведенных исследованиях установлено, что при остром охлаждении и последующем самосогревании организма крыс увеличивается интенсивность перекисного окисления липидов (ПОЛ) биомембран печени, сердца и головного мозга. Наиболее заметные изменения интенсивности ПОЛ были отмечены через 3 и 24 часа самосогревания животных [1]. Активация ПОЛ в ряде жизненно важных органов крыс была обнаружена и при действии ряда других экстремальных факторов, а именно: голодании, ишемии, введении больших доз тетрациклина, фенобарбитала, тироксина и др. [2-4]. При этом было показано, что относительная активация ПОЛ в органах старых животных была значительно выше, чем у молодых.

Работ, касающихся возрастного аспекта изменения свободнорадикального окисления липидов биомембран при остром охлаждении и особенно при последующем самосогревании организма крайне мало. Недостаточность изученности возрастной специфики состояния свободнорадикального ПОЛ при остром холодовом повреждении объясняется еще и тем обстоятельством, что на сегодняшний день до конца не ясны молекулярно-клеточные механизмы холодового повреждения организма.

Целью исследования являлось изучение действия острого охлаждения на интенсивность свободнорадикального окисления липидов мембран организма теплокровных животных разного возраста. В настоящей работе двумя независимыми методами - по накоплению малонового диальдегида (МДА) и интенсивности хемилюминесценции, исследовали уровень спонтанного, НАДФН- и аскорбатзависимого ПОЛ в гомогенатах печени, сердца и головного мозга крыс-самцов линии Wistar 3-х и 24-месячного возраста в период их самосогревания после острого охлаждения до состояния глубокой гипотермии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Животные охлаждались в процессе свободного плавания в воде с температурой $+7^{\circ}\text{C}$ в течение 6-7 мин до ректальной температуры $19-20^{\circ}\text{C}$. Скорость охлаждения составляла $2,4-2,8^{\circ}\text{C}/\text{мин}$. После охлаждения крысы самосогревались при температуре окружающего воздуха $18-20^{\circ}\text{C}$ в течение 3 и 24 часов. Контролем служили интактные животные соответствующего возраста. Крыс забивали декапитацией, извлекали печень, сердце, мозг и охлаждали их в 100 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4). Навеску охлажденной ткани продавливали через пресс, гомогенизировали в 100 мМ трис-НСl-буфере (рН 7,4) и фильтровали через нейлоновую ткань. Соотношение навески ткани и объема среды гомогенизации - 1:3.

При изучении спонтанного ПОЛ среда инкубации содержала 100 мМ трис-НСl-буфер (рН 7,4) и 3,5-4,2 мг белка исследуемого гомогената в 1 мл. При аскорбатиндуцированном ПОЛ среда дополнительно содержала 0,5 мМ аскорбата и 12 мкМ соли Мора, а в случае НАДФН-индуцированного ПОЛ - 1 мМ НАДФН, 4 мМ АДФ и 12 мкМ соли Мора. Реакцию проводили на водяной бане при температуре 37°C с непрерывным барботированием воздухом. Уровень МДА и светосумму хемилюминесценции определяли за 10 мин инкубации в случае НАДФН- и аскорбатиндуцированного ПОЛ, а в случае спонтанного - за 30

Влияние острого охлаждения на свободнорадикальное окисление ...

мин. Спектры поглощения МДА записывали на двухлучевом регистрирующем спектрофотометре Specord UV Vis (ГДР), а его количество рассчитывали используя коэффициент молярной экстинкции равный $1,56 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$. В качестве хемилюминометра использовали промышленный гамма-счетчик 22024-RFT (ГДР) с некоторыми конструктивными изменениями [5]. Белок определяли по Лоури в модификации Миллера [7]. Полученные данные обрабатывали статистически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Представленные в табл. 1 данные свидетельствуют, что у intactных животных скорость накопления МДА в гомогенатах печени и сердца молодых 3-месячных крыс при всех способах индукции ПОЛ была выше, чем у старых, 24-месячных. Сходные, но несколько менее выраженные возрастные изменения уровня спонтанного, НАДФН- и аскорбатиндуцированного свободнорадикального окисления липидов в печени и сердце крыс наблюдались и при регистрации интенсивности хемилюминесценции (табл. 2). Эти результаты согласуются с ранее полученными данными в гомогенатах, митохондриях и микросомах печени и сердца животных [2-5].

Таблица 1. Накопление МДА при перекисном окислении липидов мембран печени, сердца и головного мозга крыс 3- и 24-месячного возраста в контроле после острого охлаждения организма (нмоль МДА на 1 мг белка гомогената; n= 5-9)

Орган	Время после острого охлаждения, час	Накопление МДА при ПОЛ				
		спонтанном	NADPH-зависимом	аскорбат-зависимом		
Печень	3-месячные	контроль	0,42 ± 0,03	7,05 ± 0,61	8,93 ± 0,53	
		3	0,52 ± 0,04 6	7,30 ± 0,64	10,51 ± 0,32**	
		24	0,58 ± 0,05**	9,02 ± 0,54**	11,41 ± 0,74**	
		24-месячные	контроль	0,34 ± 0,03 а	5,26 ± 0,46*	6,45 ± 0,63*
			3	0,57 ± 0,05**	6,17 ± 0,29	8,07 ± 0,49 6
			24	0,56 ± 0,04**	7,43 ± 0,25**	9,85 ± 0,67**
	Сердце	3-месячные	контроль	0,29 ± 0,04	1,26 ± 0,14	0,81 ± 0,12
			3	0,31 ± 0,05	1,37 ± 0,15	0,95 ± 0,28
			24	0,34 ± 0,07	1,70 ± 0,12**	1,26 ± 0,19 6
		24-месячные	контроль	0,10 ± 0,03	0,82 ± 0,07*	0,32 ± 0,04*
3	0,11 ± 0,05		0,90 ± 0,15	0,40 ± 0,08		
24	0,14 ± 0,02		1,08 ± 0,08**	0,50 ± 0,06**		
Мозг	3-месячные	контроль	1,32 ± 0,25	4,37 ± 0,24	2,67 ± 0,22	
		3	1,37 ± 0,11	5,47 ± 0,24**	3,18 ± 0,49	
		24	1,45 ± 0,10	5,38 ± 0,21**	3,88 ± 0,31**	
		24-месячные	контроль	0,74 ± 0,08	3,24 ± 0,49	0,41 ± 0,08*
			3	0,91 ± 0,19	3,95 ± 0,08	1,05 ± 0,10**
			24	1,16 ± 0,12**	5,07 ± 0,47**	2,26 ± 0,48**

* - $p < 0,05$ относительно 3-месячных контрольных животных;

** - $p < 0,05$ относительно контрольных животных соответствующего возраста;

а - $0,05 < p < 0,1$ относительно 3-месячных контрольных животных;

б - $0,05 < p < 0,1$ относительно контрольных животных соответствующего возраста.

В головном мозгу intactных животных скорость накопления МДА у молодых крыс была выше только при аскорбатиндуцированном ПОЛ, а интенсивность хемилюминесценции - при спонтанном и аскорбатиндуцированном ПОЛ (табл. 2).

Острое охлаждение и последующее самосогревание в течение 3-х часов приводило к некоторому повышению ($0,05 < p < 0,1$) скорости накопления МДА в печени 3-месячных крыс (табл. 1) при спонтанном ПОЛ. После 24 часов самосогревания интенсивность спонтанного ПОЛ увеличивалась в 1,4 раза, по

сравнению с интактными животными. У старых, 24-месячных крыс достоверное повышение интенсивности спонтанного ПОЛ в печени наблюдалось как после 3-х, так и после 24-х часов самосогревания. При этом необходимо отметить, что относительное повышение скорости накопления МДА у старых животных было более выраженным (табл.1).

Таблица 2. Интенсивность хемилюминесценции при перекисном окислении липидов мембран печени, сердца и головного мозга крыс 3- и 24-месячного возраста в контроле и после острого охлаждения организма (имп. на 1мг белка гомогената; $n=5-9$)

Орган	Время после острого охлаждения, (час)	Интенсивность хемилюминесценции при ПОЛ			
		спонтанном	NADPH-зависимом	аскорбат-зависимом	
Печень	3-месячные	контроль	506 ± 55	6945 ± 615	7298 ± 488
		3	675 ± 52**	7071 ± 670	8711 ± 546 б
		24	809 ± 79**	9256 ± 828**	7999 ± 1352
		контроль	418 ± 58	4762 ± 541*	6031 ± 437 а
		3	664 ± 33**	5026 ± 499	8709 ± 404**
		24	732 ± 38**	7033 ± 636**	10409 ± 632**
	24-месячные	контроль	418 ± 58	4762 ± 541*	6031 ± 437 а
		3	664 ± 33**	5026 ± 499	8709 ± 404**
		24	732 ± 38**	7033 ± 636**	10409 ± 632**
		контроль	418 ± 58	4762 ± 541*	6031 ± 437 а
		3	664 ± 33**	5026 ± 499	8709 ± 404**
		24	732 ± 38**	7033 ± 636**	10409 ± 632**
Сердце	3-месячные	контроль	428 ± 62	940 ± 125	1066 ± 127
		3	458 ± 81	1376 ± 121**	1175 ± 109
		24	582 ± 54 б	1455 ± 191**	1790 ± 150**
		контроль	247 ± 60 а	870 ± 199	517 ± 96*
		3	310 ± 112	891 ± 41	1051 ± 182**
		24	314 ± 38	942 ± 194	1054 ± 157**
	24-месячные	контроль	247 ± 60 а	870 ± 199	517 ± 96*
		3	310 ± 112	891 ± 41	1051 ± 182**
		24	314 ± 38	942 ± 194	1054 ± 157**
		контроль	247 ± 60 а	870 ± 199	517 ± 96*
		3	310 ± 112	891 ± 41	1051 ± 182**
		24	314 ± 38	942 ± 194	1054 ± 157**
Мозг	3-месячные	контроль	1250 ± 88	4834 ± 897	1822 ± 308
		3	1374 ± 185	5340 ± 407	2302 ± 30
		24	1619 ± 152	5229 ± 564	2727 ± 238
		контроль	562 ± 39*	2865 ± 199 а	549 ± 111*
		3	899 ± 176 б	3823 ± 479 б	1357 ± 41**
		24	1165 ± 37	3980 ± 385**	1473 ± 172**
	24-месячные	контроль	562 ± 39*	2865 ± 199 а	549 ± 111*
		3	899 ± 176 б	3823 ± 479 б	1357 ± 41**
		24	1165 ± 37	3980 ± 385**	1473 ± 172**
		контроль	562 ± 39*	2865 ± 199 а	549 ± 111*
		3	899 ± 176 б	3823 ± 479 б	1357 ± 41**
		24	1165 ± 37	3980 ± 385**	1473 ± 172**

* - $p < 0,05$ относительно 3-месячных контрольных животных;

** - $p < 0,05$ относительно контрольных животных соответствующего возраста;

а - $0,05 < p < 0,1$ относительно 3-месячных контрольных животных;

б - $0,05 < p < 0,1$ относительно контрольных животных соответствующего возраста.

При НАДФН-индуцированном ПОЛ скорость накопления МДА в печени животных обеих возрастных групп повышалась только к 24-му часу постхолодового периода. При этом, как и в случае спонтанного ПОЛ, относительная активация НАДФН-индуцированного ПОЛ была существенно выше у 24-месячных крыс.

Аналогичные возрастные особенности активации ПОЛ в гомогенатах печени имели место и при индукции аскорбатом. После 24-х часов самосогревания скорость накопления МДА у 3-месячных крыс повышалась в 1,3 раза, а у старых животных - более, чем в 1,5 раза.

Сходные возрастные изменения свободнорадикального окисления липидов печени крыс в ответ на холодовое воздействие наблюдалось и при измерении интенсивности спонтанной, НАДФН- и аскорбат-индуцированной хемилюминесценции (табл. 2). При этом интенсивность хемилюминесценции хорошо коррелировала с уровнем МДА ($r = 0,92 \pm 0,1$; $p < 0,001$).

В сердце крыс обеих исследованных возрастных групп изменения скорости накопления МДА и интенсивности хемилюминесценции в ответ на холодовое воздействие было менее выражено, чем в печени. Однако, при аскорбат-индуцированной хемилюминесценции относительное увеличение данного показателя через 3 и 24 часа самосогревания у молодых животных составляло 10% и 68%, а у старых -

3% и 4%, соответственно (табл. 1 и 2). Коэффициент корреляции между изученными показателями интенсивности ПОЛ составлял $r=0,81 \pm 0,15$ ($p<0,001$).

В головном мозгу молодых крыс скорость накопления МДА в ответ на действие холодового фактора достоверно повышалась только при НАДФН- и аскорбатиндуцированном ПОЛ. У старых крыс повышение скорости накопления МДА наблюдалось при всех способах индукции ПОЛ. При этом относительная активация ПОЛ была более выражена у старых животных. Так, в мозгу молодых крыс скорость накопления МДА после 24-х часов самосогревания увеличивалась в 1,1; 1,2 и 1,5 раза, а у старых - в 1,6; 1,6 и 5,5 раза при спонтанном, НАДФН- и аскорбатиндуцированном ПОЛ, соответственно. Аналогичные, и столь же выраженные возрастные изменения активации спонтанного, НАДФН- и аскорбатиндуцированного ПОЛ были обнаружены при определении интенсивности хемилюминесценции (табл. 2). Между изученными показателями интенсивности ПОЛ в головном мозгу так же, как и в печени и сердце, наблюдалась строгая корреляция ($r=0,91 \pm 0,10$; $p<0,001$).

Таким образом, нами были выявлены возрастные и подтверждены ранее обнаруженные тканеспецифические эффекты влияния низких температур на организм крыс в период выхода из состояния глубокой гипотермии (через 3 часа) и на более отдаленном этапе развития холодового повреждения (через 24 часа). Тканеспецифические особенности состояния ПОЛ в этих условиях, как уже отмечалось ранее [1,6], могут объясняться различиями качественного и количественного состава липидов, спектром антиоксидантных ферментов и неферментативных антиоксидантов, а также физиологическими и биохимическими механизмами терморегуляции. Возрастные различия активации ПОЛ в органах экспериментальных животных согласуются с ранее полученными данными при изучении действия других экстремальных факторов на организм [4] и, по-видимому, связаны со "срывом" ферментативной антиоксидантной защиты.

ВЫВОДЫ

Полученные данные свидетельствуют о том, что интенсивность свободнорадикального окисления липидов в печени, сердце и головном мозгу крыс в ответ на холодовое воздействие увеличивалась к 24-му часу постхолодового периода в обеих возрастных группах животных. Относительная активация ПОЛ была более выражена у старых, 24-месячных животных.

Корреляционный анализ результатов, полученных двумя независимыми методами исследования свидетельствует об адекватности изменения уровня ПОЛ при индукции свободнорадикальных реакций окисления липидов НАДФН и аскорбатом в гомогенатах изученных органов в процессе самосогревания после острого охлаждения организма.

Тот факт, что относительная активация ПОЛ после холодового воздействия увеличивается с возрастом, определяет необходимость дополнительной антиоксидантной коррекции при лечении холодовой травмы у людей пожилого возраста.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Овсянников С.Е., Никитченко Ю.В., Мазалов В.К., Луговой В.И. // Проблемы криобиологии. 1996. N4. С.37-41.
2. Лемешко В.В., Доркина Е.Г., Никитченко Ю.В., Василенко Ю.К. // Вопр. мед. химии. 1989. N5. С.49-54.
3. Никитченко Ю.В., Дзюба В.Н., Лемешко В.В. // Биологический вестник. 1997. N2. С.23-29.
4. Никитченко Ю.В. // Биологический вестник. 1997. N2. С.26-31.
5. Лемешко В.В., Никитченко Ю.В., Овсянников С.Е., Свич И.В. // Докл. АН УССР. 1986. Сер. Б. N2. С.60-62.
6. Овсянников С.Е. // Автореф. канд. биол. наук. - Харьков, 1996. - 22 с.
7. Miller G.L. // Anal. Chem. 1959. N5. P.964-966.

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 534.6.08

ДОПЛЕРОВСКАЯ РЕГИСТРАЦИЯ СДВИГОВЫХ ДЕФОРМАЦИЙ В ФАНТОМАХ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ИНДУЦИРОВАННЫХ ФОКУСИРОВАННЫМ УЛЬТРАЗВУКОВЫМ ИЗЛУЧЕНИЕМ**Е.А.Баранник, С.А.Гирнык, Д.А.Толстолужский, В.В.Товстяк, С.Ю.Емельянов,*
А.И.Марусенко**, А.П.Сарвазян******Харьковский национальный университет, физико-технический факультет, 61108, г. Харьков, пр. Курчатова, 31***Biomedical Engineering Department, University of Michigan, 2350 Hayward Street, Ann Arbor, MI 48109****ОАО Научно-исследовательский институт радиотехнических измерений, 61054, г. Харьков, пр. Ак. Павлова, 271*****Artann Laboratories, 1 Riva Avenue, North Brunswick, NJ 08902**E-mail: girnyk@pht.univer.kharkov.ua*

Поступила в редакцию 16 ноября 2000г.

Исследовано пространственное распределение смещений в моделях мягких тканей, вызванных радиационным давлением фокусированного импульсного ультразвукового излучения, являющегося основой разрабатываемого SWEI метода определения упругих свойств ткани. Получены двумерные профили амплитуд локальных смещений среды и пространственной динамики распространения сдвиговых волн. Показано, что для использовавшихся значений интенсивности и длительности возбуждающих импульсов полученные амплитуды смещений среды в фантоме ткани находятся в хорошем соответствии с имеющимися теоретическими оценками. Измерения амплитуд смещений ткани проводились с использованием ультразвукового доплеровского метода.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фантом мягких тканей, сдвиговая волна, фокусированный ультразвук, смещение ткани, доплер, упругость, SWEI.

Проблема неинвазивного определения упругих характеристик мягких тканей в медицинской диагностике является наиболее актуальной и исследуемой в последнее время. Изменения упругости мягких тканей часто связано с различного рода их патологическими изменениями [1]. Традиционная ультразвуковая диагностика, основанная на построении изображения тканей по их эхогенности, обладая рядом преимуществ и широтой диагностических возможностей по сравнению с другими методами, в то же время не позволяет уверенно диагностировать различие в упругости тканей. Однако известно, что различие в упругости между тканями может быть очень существенным при небольших различиях в модуле объемной упругости, являющимся основой для обычного ультразвукового способа визуализации тканей [2,3]. Для разрешения этой проблемы медики часто используют пальпацию как наиболее простой и традиционный способ определения упругих свойств. Однако если область локализации патологических изменений расположена глубоко в тканях или имеет небольшие геометрические размеры такой метод становится неэффективным. Кроме того, такой способ является существенно субъективным.

Разрабатываемые в последнее время новые методы ультразвуковой эластографии имеют своей целью получение количественных характеристик упругости тканей. Общим подходом в этих методах является измерение движения ткани в ответ на внешне или внутренне приложенную силу и последующую реконструкцию упругих параметров. Для этих целей используется как статически, так и динамически прикладываемые внешние силы [4-6]. Методы исследования, использующие статические внешние силы для сжатия ткани и последующего измерения возникающих напряжений с помощью ультразвуковых методов обладают рядом недостатков. Приложение внешней силы, вызывает широкое пространственное распределение поля напряжений в тканях. Анализ ответного отклика в этом случае усложняется из-за часто непредсказуемых изменений структуры поля напряжений на различной глубине вследствие неоднородности исследуемой ткани еще до того, как это поле достигнет исследуемой области.

Альтернативной стратегией исследования является приложение локализованных напряжений непосредственно или рядом с интересующей областью [7-8]. Одним из способов достижения этого является использование радиационной силы фокусированного ультразвукового пучка. В таком случае импульсное ультразвуковое излучение большой интенсивности, создавая радиационное давление в фокусе приводит к возникновению локальных деформаций ткани. Результирующие переходные деформации измеряются как функция времени с помощью ультразвуковых доплеровских методов. Одной из разновидностей этих методов является способ получения изображений упругих свойств с помощью удаленной генерации сдвиговых волн – Shear Wave Elasticity Imaging (SWEI), возникающих в области фокуса преобразователя. Удаленная генерация дает ряд потенциальных преимуществ по

Доплеровская регистрация сдвиговых деформаций ...

сравнению с другими методами, включая возможность локально тестировать сжимаемость ткани с минимальными последствиями от артефактов, вызванных различием упругости близлежащих тканей и потенциальными возможностями реализации данного способа визуализации в реальном режиме времени. Исследование отклика материала тканей характеризующегося такими параметрами как амплитуда смещений, время релаксации и скорость распространения возбуждаемых сдвиговых волн представляет возможность для количественного определения локальных констант упругости тестируемой области. Важной задачей, требующей отдельного детального исследования является выбор метода регистрации смещений и математическая обработка получаемых данных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Теоретические аспекты SWEI, появившегося несколько лет назад были проанализированы в работах Сарвазяна с соавторами [9-13]. Принципиальная возможность метода SWEI была ранее продемонстрирована в экспериментах по регистрации смещений среды методами оптической регистрации и с помощью ядерного магнитного резонанса [8]. Предварительные результаты по ультразвуковой доплеровской регистрации сдвиговых смещений среды и динамике распространения возбуждаемых сдвиговых волн была продемонстрирована нами в работе [14]. Целью данной работы являлось исследование пространственного распределения амплитуд сдвиговых деформаций в фантомах биологических тканей используя SWEI – метод генерации сдвиговых возбуждений.

Акустическая радиационная сила представляет собой явление связанное с распространением волн через диссипативные среды. Она вызвана наличием градиента плотности акустической энергии наблюдающимся в среде, возникающего вследствие поглощения или отражения акустических волн [9]. Наличие градиента приводит к появлению однонаправленной силы в направлении распространения волны. В поглощающей среде и в приближении плоских волн эта сила может быть представлена следующим уравнением [15]:

$$F = \frac{W}{c} = \frac{2 \cdot \alpha \cdot I}{c} \quad (1)$$

где: F – акустическая радиационная сила, W – поглощенная мощность в среде в данной точке пространства, α – коэффициент абсорбции среды, I – усредненная по времени интенсивность волны в данной точке пространства, c – скорость продольных волн в среде.

При возбуждении сдвиговых волн с помощью импульсной модуляции ультразвукового пучка выражение для величины смещений ткани на оси пучка в фокальной плоскости может быть представлено в виде [8]:

$$S = \frac{\sqrt{\pi}}{2} \frac{\alpha a^2 I_0}{\rho c_t c} \exp(-2\alpha d) \left(\frac{t_0}{aD} \right) \frac{\left(\frac{c_t}{aD} \right) t}{1 + \left(\frac{c_t}{aD} \right)^2 t^2} \quad (2)$$

Своего максимального значения, равного

$$S = \frac{\sqrt{\pi}}{4} \frac{\alpha a^2 I_0}{\rho c_t c} \exp(-2\alpha d) \left(\frac{t_0}{aD} \right), \quad (3)$$

эта величина достигает, очевидно, при $t = aD/c_t$.

где: $2a$ – апертура фокусирующего ультразвукового преобразователя накачки, d – радиус кривизны активного элемента преобразователя, $I_0 = P_0^2 / 2 \cdot \rho \cdot c$ – интенсивность волн накачки на оси пучка вблизи поверхности преобразователя, t_0 – длительность модулирующего импульса. Величина D является обратной к параметру фокусировки: $D^{-1} = \gamma = l_F / d$, где $l_F = ka^2 / 2 = \pi a^2 / \lambda$ – длина Френеля, c_t – скорость сдвиговых волн в среде.

Чтобы вычислить величину I_0 используя значение интенсивности волн накачки в фокусе, можно воспользоваться известными соотношениями между этими величинами для пучков волн с гауссовским распределением амплитуды колебаний на излучающей поверхности [18]. В этом случае

$$I_0 = I \frac{d^2}{l_F^2}. \quad (4)$$

Подставляя (4) в (3) и учитывая пренебрежимо малую величину поглощения ультразвука в воде, где производились измерения интенсивности пучков накачки, по сравнению с поглощением в материале фантома, приходим к окончательному выражению для величины смещений

$$S_{\text{max}} = \frac{1}{4\sqrt{\pi}} \frac{\alpha t_0 d}{\rho c_l f a} I, \quad (5)$$

где f – несущая частота волн накачки.

Проведенные в данной работе исследования были выполнены на базе украинского коммерческого ультразвукового диагностического сканера ТИ628А, который был разработан в Украине (ОАО Научно-исследовательский институт радиотехнических измерений, г. Харьков). Используемый образец сканера был переработан в аппаратной и программной части для получения возможности контроля и изменения характеристик мощного ультразвукового пучка – длительности, интенсивности и частоты повторения импульсов [16]. В качестве зондирующих применялись стандартные импульсы используемые для визуализации в общепринятом В-режиме. Параметры зондирующих импульсов имели следующие значения – несущая частота 3,5 МГц, частота повторения импульсов 3,66 КГц, длительность импульсов – 1 мкс, фокусное расстояние – 80 мм. Использовались следующие параметры импульсов мощного преобразователя накачки – несущая частота – 1 МГц, длительность импульсов накачки – 1,08 миллисекунды, интенсивность в фокусе преобразователя $I_{\text{SPPA}} = 145 \text{ Вт/см}^2$, частота повторения импульсов 14,59 Гц, фокусное расстояние – 70 мм.

Измерение интенсивности ультразвукового излучения I_0 преобразователя накачки в фокусе проводились с помощью измерительного гидрофона, откалиброванного по методу взаимности в соответствии со стандартом IEC 865 (International Electro-Technical Committee). Конструкция гидрофона представляет собой пьезокерамический элемент диаметром 1 мм, закрепленный на конце иглы длиной 50 мм. Измеренная чувствительность гидрофона в полосе частот 0,8 – 1,2 МГц составила $2 \pm 0,2 \text{ мкВ/Па}$. Измерения интенсивности ультразвукового поля накачки с помощью гидрофона проводились в дистиллированной воде при комнатной температуре. Во время проведения измерений интенсивности преобразователь накачки работал в режиме излучения коротких импульсов длительностью 200 мкс. Это значение длительности было выбрано для исключения возможности возникновения стоячих волн в фокусе преобразователя и, кроме того, для выбранного значения длительности амплитуда принятого акустического сигнала гидрофоном была постоянной и не зависела от длительности излученного импульса.

В качестве фантома биологической ткани был использован водный раствор желатина с добавлением глицерина для моделирования поглощения ультразвуковых волн, аналогичного поглощению в мягких тканях. Состав смеси: вода – 2500 мл, глицерин – 500 мл, желатин – 240 г. Объем фантома составлял приблизительно 1500 мл. Измерения проводились при температуре материала фантома 16°C .

Зондирующий преобразователь и преобразователь накачки

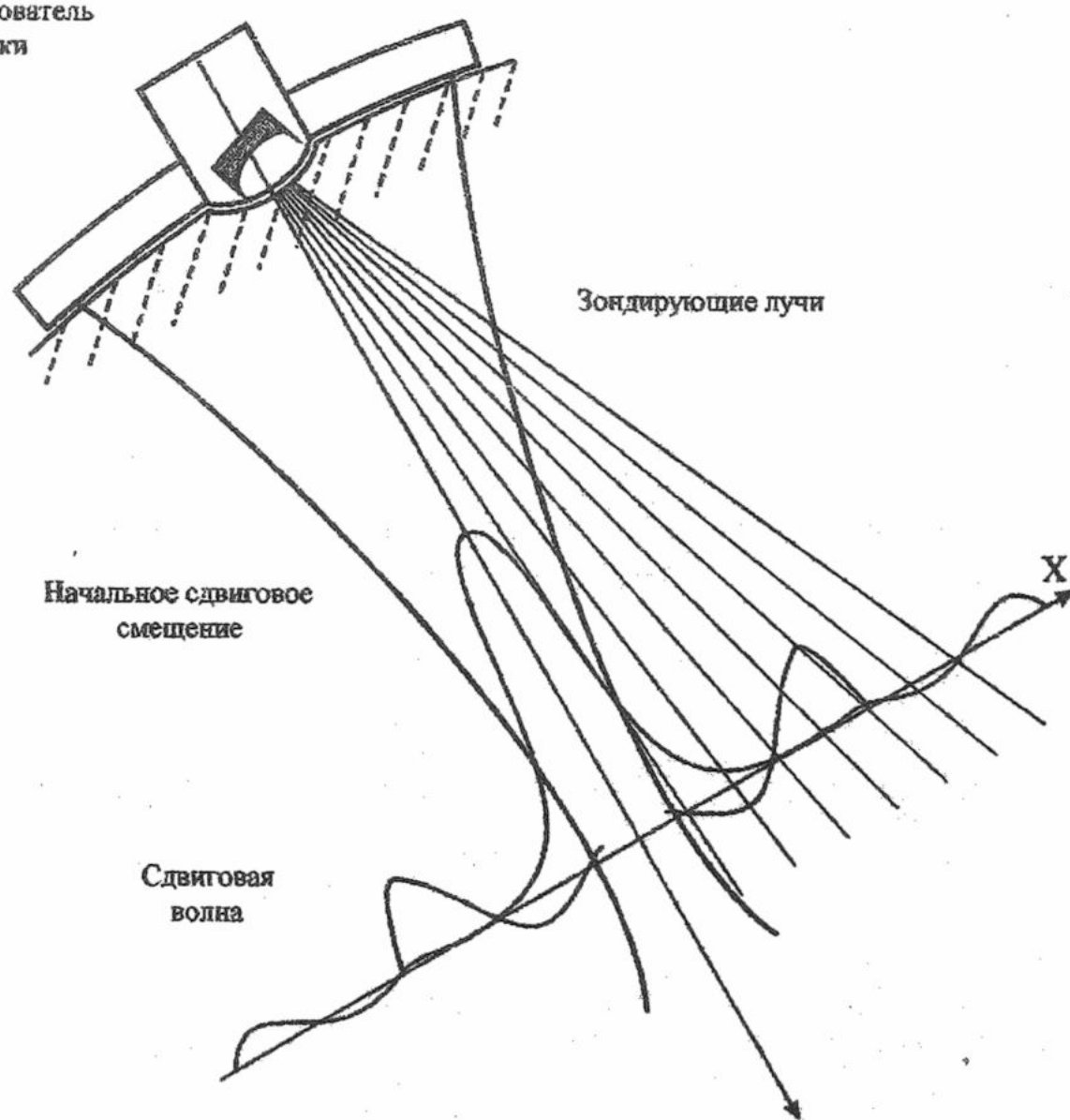


Рис. 1. Схема проведения измерений

В ходе проведения эксперимента фокальные точки преобразователя накачки и зондирующего совмещались с помощью юстировочного устройства, фантом располагался непосредственно впереди совмещенных преобразователей таким образом, чтобы фокальная область располагалась внутри фантома, как показано на Рис. 1.

Измерения амплитуд смещений ткани и времен задержек распространения сдвиговых волн выполнялись последовательно в точках расположенных в плоскости сканирования.

Обработка данных проводилась в режиме реального времени и выполнялась обычным автокорреляционным методом, являющимся общепринятым для цветного доплеровского картирования. Для увеличения точности измерений индуцированных

смещений ткани и времен задержек распространения генерируемых сдвиговых волн применялось накопление данных с последующим усреднением по 30–40 измерениям на одну точку. Время, затрачиваемое на получение данных по каждой точке составляло около 4–5 сек.

Накопление данных по каждой точке было возможным вследствие того, что частота повторения зондирующих импульсов была кратна частоте повторения импульсов накачки. Вследствие этого измерения амплитуд смещений после окончания каждого импульса накачки начинались с одной и той же фазы процесса релаксации индуцированных смещений ткани.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На Рис.2 представлена типичная динамика релаксации локального сдвигового возмущения, полученная в точке, находящейся вблизи фокуса преобразователя накачки на расстоянии около 5 мм. По оси X – время, по оси Y – амплитуда смещений ткани фантома в микрометрах. Более темная вертикальная полоса обозначает окончание действия импульса накачки. Распространяющаяся сдвиговая

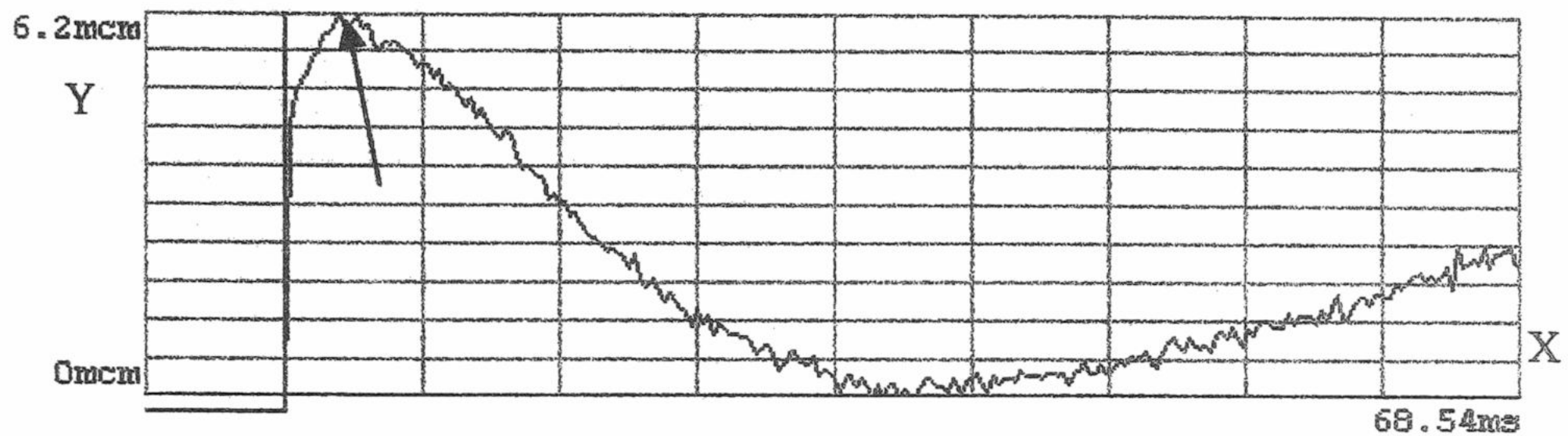


Рис.2. Динамика релаксации сдвигового возмущения

волна, максимум смещений среды в которой находится в фокусе преобразователя, по мере удаления от точки возникновения поглощается, что регистрируется по уменьшению амплитуды смещений среды. По мере удаления от фокуса максимум амплитуды смещений среды достигается со все более увеличивающейся задержкой во времени. Полученное время задержки распространения сдвиговой волны, определяемое по времени достижения максимума смещения (на рисунке показано стрелкой) в точке проведения измерений, совместно с известным расстоянием до этой точки может быть использовано для определения средней скорости распространения сдвиговой волны на данном участке ткани. Характерные значения скорости сдвиговых волн в материале использовавшего фантома имеют величину порядка 1,5 м/с. Следует отметить достаточно медленную скорость релаксации смещения ткани, со временем порядка 30 миллисекунд и наличие осцилляций с большим периодом. Для построения двумерного распределения упругих характеристик ткани (Рис.3.) измерения амплитуд

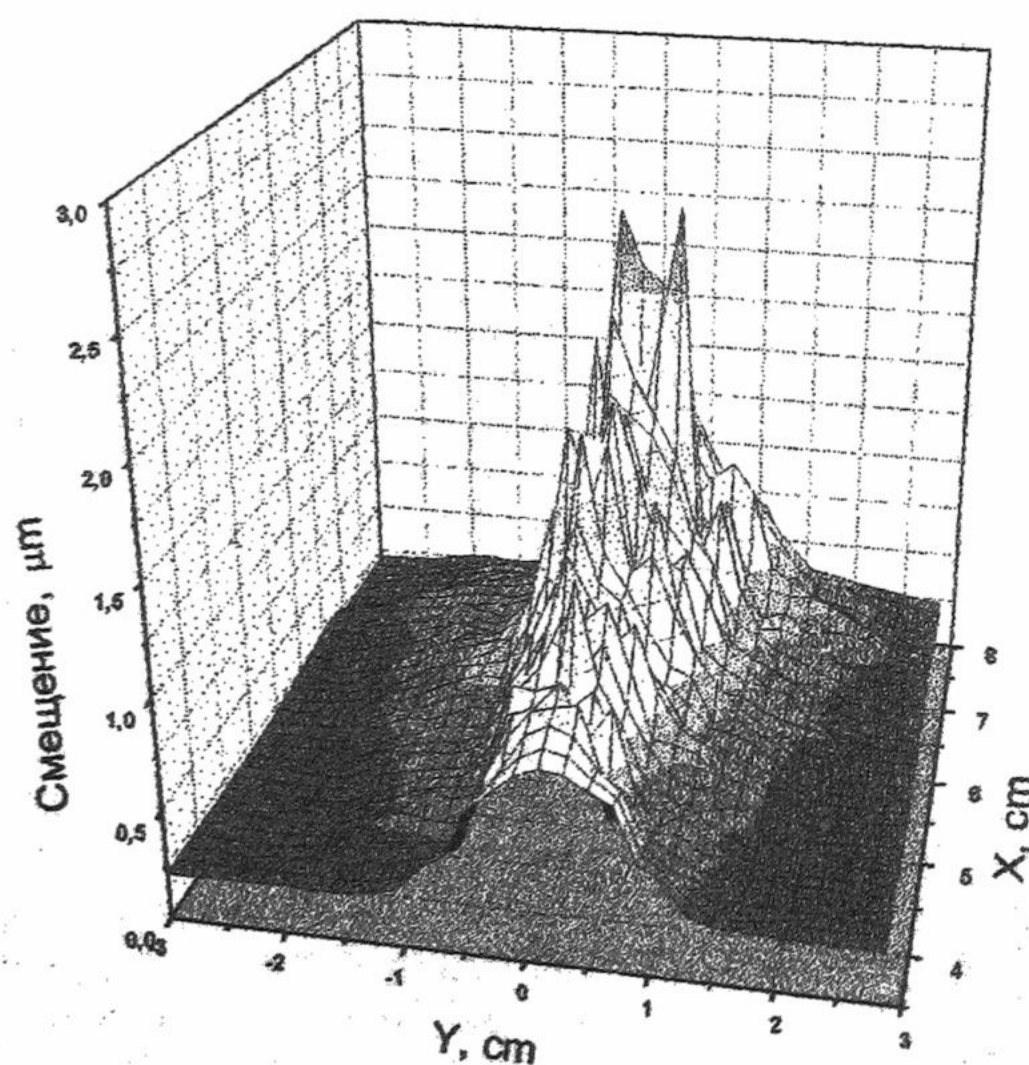


Рис.3. Профиль максимальных значений амплитуд смещений ткани в плоскости сканирования

смещений и времен задержек распространения сдвиговой волны были выполнены в массиве точек вокруг фокальной области в плоскости сканирования. На рисунке показано полученное пространственное распределение амплитуды сдвиговых возмущений в окрестности фокуса преобразователя накачки. На рисунке ось X направлена вдоль оси преобразователя накачки, ось Y , соответственно, в перпендикулярном направлении.

Следует отметить, что представленные на рисунке амплитуды смещений отображают максимальные значения смещений ткани в плоскости сканирования. Как видно из представленного рисунка, максимальное значение амплитуды смещений ткани достигается в области фокуса преобразователя накачки. Постепенное уменьшение амплитуды по мере удаления от фокуса обусловлено поглощением сдвиговой волны в материале фантома. Наблюдаемые достаточно резкие отличия амплитуд смещений в смежных точках, в отличие от ожидаемого их плавного уменьшения, отражают спекловый характер полученного двумерного изображения, обусловленный когерентностью ультразвукового излучения. Для устранения получаемых артефактов следует использовать различные корреляционные методы обработки изображений, так называемую технику speckle tracking.

Следующим параметром, необходимым для определения упругих свойств ткани является скорость сдвиговых волн, которую можно оценить по времени их распространения на отдельных участках ткани. На Рис.4. представлено пространственное распределение времен распространения сдвигового возмущения для данного фантома в плоскости сканирования. В нижней части рисунка дополнительно показаны уровни равных значений времени задержки распространения сдвиговой волны.

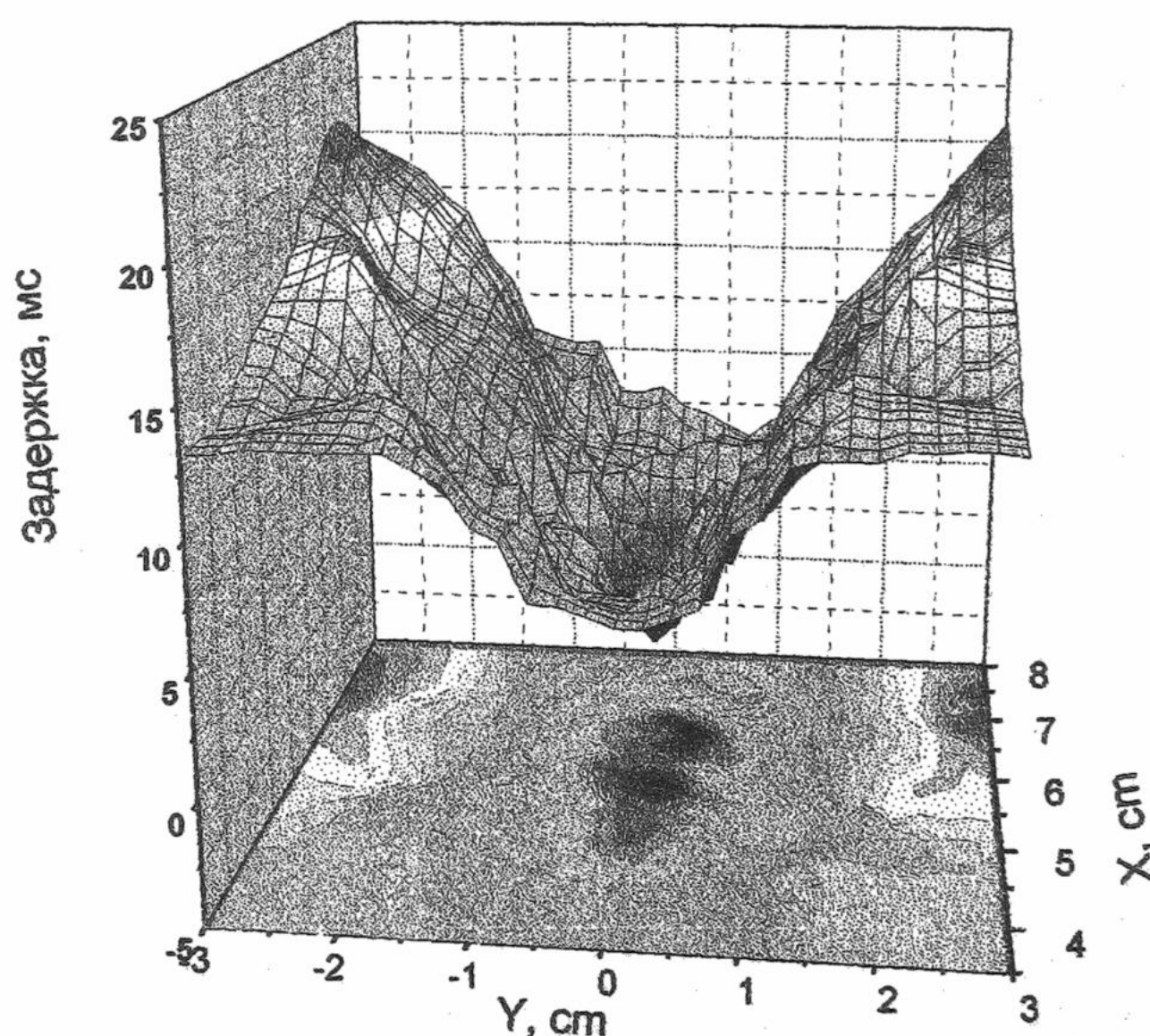


Рис.4. Двумерный профиль величин задержки распространения сдвиговой волны

Из рисунков 3, 4 видно, что распространяющаяся сдвиговая волна имеет осевую симметрию. Кроме того, наблюдается распространение сдвиговой волны вдоль оси преобразователя как в прямом, так и обратном направлениях. Кажущаяся разница в скорости распространения волны в поперечном и продольном направлении от фокуса преобразователя вызвана, по всей видимости, не анизотропией свойств материала фантома, а достаточно протяженной фокальной областью преобразователя накачки, имеющей продольную протяженность порядка 2 см. Именно этим фактором, скорее всего, обусловлены меньшие времена задержек прихода максимума волны до точек, находящихся на одинаковом расстоянии от фокуса, но расположенных в аксиальном и радиальном направлении относительно оси преобразователя.

К сожалению, из представленных данных на Рис.3. нельзя определить пространственное распределение амплитуд первичных смещений среды, сразу после окончания импульса накачки, поскольку нами проводились измерения только задержек времени от момента окончания импульса до

достижения максимального значения смещений среды, т.е. до прихода максимума волны сдвига. Определения амплитуд первичных смещений среды даст более полное представление о профиле возбуждаемых сдвиговых возмущений среды и динамике их релаксации.

ВЫВОДЫ

Полученные в настоящей работе экспериментальные результаты пространственного распределения сдвиговых возмущений в тканях являются продолжением работ по разработке метода SWEI – диагностики упругих свойств тканей с использованием ультразвукового доплеровского метода измерений [16]. Этот метод, наиболее часто применяемый при цветном доплеровском картировании в ультразвуковой медицинской диагностике, представляется весьма перспективным с практической точки зрения для измерения вязкоупругих свойств тканей ввиду своей относительной простоты и возможности реализации в реальном масштабе времени. Последнее особенно важно, например, при необходимости получения оперативной информации о состоянии мышечных тканей в локальной области. Представленные в данной работе результаты указывают на то, что SWEI – метод, реализованный в реальном масштабе времени имеет значительные потенциальные возможности применительно к медицинской практике.

Данная работа была выполнена при поддержке НТЦУ, грант №865.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fung Y.C. Biomechanics. Mechanical Properties of Living Tissue. N.Y.: Springer-Verlag, 1981.
2. A.P.Sarvazyan, V.I.Pasechnik, S.E.Shnol. Low speed of sound in gels and biological tissue. Biophysika, V.13, P.587-594, 1968.
3. S.A.Goss, R.L.Jonhston, F.Dunn. Comprehensive compilation of empirical ultrasonic properties of mammalian tissues. J.Acoust. Soc.Amer., V.64, P.423-457, 1978.
4. J.Ophir, I.Céspedes, H.Ponnecanti, Y.Yazdi, X.Li. Elastography: A Quantitative Method for Imaging the Elasticity of Biological Tissue. Ultrasonic Imaging, V.13, P.111-134, 1990.
5. K.Parker, S.Huang, R.Musulin, R.Lerner. Tissue Response to Mechanical Vibration for Sonoelasticity Imaging. Ultrasound Med. Biol. V.16, P.241-246, 1990.
6. A.R.Skovoroda, S.Y.Emelianov, M.O'Donnel. Tissue Elasticity Reconstruction Based on Ultrasonic Displacement and Strain Images. IEEE Trans. Ultras., Ferroelec., Freq. Contr. V.42. N.4, P.747-765, 1995.
7. T.Sugimoto, S.Ueha, K.Itoh. Ultrason.Symp.Proc., P.1377-1380, 1990.
8. A.P.Sarvazyan, O.V.Rudenko, S.D.Swanson, J.B.Fowlks, S.Y.Emelianov. Shear wave elasticity imaging: A new ultrasonic technology of medical diagnostics. Ultrasound Med.Biol., V.24, P.1419-1435, 1998.
9. Sarvazyan, A.P.; Skovoroda A.R.; Emelianov, S.Y.; Fowlkes J.B.; Pipe J.G.; Adler, R.S.; Buxton, R.B.; and Carson, P.L. "Biophysical bases of elasticity imaging", Acoustical Imaging 21, 223-240 (1995).
10. Sarvazyan, A.P. "Method and device for shear wave elasticity imaging", US Patent 5,606,971 (1997).
11. Rudenko O.V.; Sarvazyan, A.P.; and Emelianov, S.Y. "Acoustic radiation force and streaming induced by focused nonlinear ultrasound in a dissipative medium", J. Acoust. Soc. Am. 99, 2791-2798 (1996).
12. Andreev, V.G.; Dmitriev, V.N.; Pischalnikov, Y.A.; Rudenko, O.V.; Sapozhnikov, O.A.; and Sarvazyan, A.P. "Observation of shear waves excited by focused ultrasound in a rubber-like media", Acoust. Phys. 43, 123-128 (1997).
13. Andreev, V.G.; Dmitriev, V.N.; Rudenko, O.V.; and Sarvazyan, A.P. "Remote generation of shear wave in soft tissue by pulsed radiation pressure", J. Acoust. Soc. Am. 102, 3155-3158 (1997).
14. E.A.Barannik, S.A.Girnyk, V.V.Tovstiyak, A.P.Sarvazyan. Doppler Ultrasound Detection Of Shear Waves Remotely Induced In Tissue Phantoms By Focused Ultrasound./ 140th Meeting Of The Acoustical Society Of America// JASA, Vol. 108, Pt.2 of 2, P. 2549, 2000.
15. G.Torr. The acoustic radiation force. Am.J.Phys. V.52, P.402-408, 1984.
16. Е.А.Баранник, В.А.Волохов, С.А.Гирнык, А.И.Марусенко, В.В.Товстяк. Метод измерения скорости медленных потоков жидкости.//Вісник Харківського університету.Серія фізична "Ядра, частинки, поля" - № 490, Випуск 3(11). - С. 75-79, 2000.

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК: 577.3+621.384.8

ПРОГРЕСС ТЕХНИКИ БИМЕДИЦИНСКОГО МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО ЭКСПЕРИМЕНТА КАК ПРИМЕР ВЛИЯНИЯ ПОТРЕБНОСТЕЙ ОБЩЕСТВА НА РАЗВИТИЕ НАУКИ**М.В. Косевич, В.С. Шелковский**

*Физико-технический институт низких температур им. Б.И. Веркина НАН Украины,
пр. Ленина 47, Харьков, 61164, Украина, e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua, shelkovsky@ilt.kharkov.ua
Поступила в редакцию 11 октября 2000*

Целью данного обзора явилось на примере одного из активно прогрессирующих методов молекулярно-биологических и биофизических исследований - масс-спектрометрии - проанализировать взаимное влияние развития общества и отдельных областей науки. Приводится краткий обзор эволюции техники масс-спектрометрического эксперимента на протяжении XX века в зависимости от социального заказа, ориентация которого смещалась от преобладания военного заказа в середине века к исследованиям, обеспечивающим здоровый образ жизни людей в 90-е годы, от чисто фундаментальных физических задач к задачам медико-биологическим. Перечисляются основные достижения метода, среди которых наиболее значимым является реализация возможности изучения высокомолекулярных биополимеров. В результате анализа тенденций развития метода делаются заключения о наиболее перспективных направлениях исследований с использованием современных достижений техники масс-спектрометрического эксперимента. Приводится систематизация литературных данных, облегчающая ориентацию в бурном информационном потоке по рассматриваемой проблеме.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: масс-спектрометрия, биофизика, техника эксперимента, история науки

В последние годы особенно остро проявляется повышение интереса общества к практическому выходу достижений современной науки [1]. Причем, в отличие от предшествующих лет, акцент смещается с развития техники на такие области, непосредственно касающиеся жизни людей, как здравоохранение, здоровое питание, забота о чистоте окружающей среды. В рамках науки как таковой положительную роль играет своего рода обратная связь: воплощение достижений определенного этапа фундаментальных исследований в новые технологии, приборы и методы служит движущей силой перехода на следующий, зачастую - качественно новый виток развития фундаментальной науки [1]. Разработка принципиально новых типов экспериментальных приборов, повышение их чувствительности и разрешающей способности открыли возможность проводить исследования недоступных ранее объектов и явлений и обеспечили небывалый прогресс фундаментальной науки во второй половине XX-го века [1, 2]. Анализ взаимной связи потребностей общества и развития определенных областей науки и техники может быть полезным при выборе наиболее актуальных и перспективных направлений исследований.

В данном обзоре была поставлена цель проанализировать перечисленные закономерности на примере одного из бурно развивающихся методов физических, химических, биологических исследований - метода масс-спектрометрии. Будут коротко перечислены основные исторические этапы становления данного метода, приведены основные достижения в области анализа и исследования некоторых свойств биомолекул и отмечены актуальные направления приложения современной мягкоионизационной масс-спектрометрии в биофизических, молекулярно-биологических, биомедицинских исследованиях. Также будут приведены данные, касающиеся поиска научно-технической информации по затронутым вопросам.

ИСТОРИЧЕСКИЙ ОЧЕРК

Одним из мощных экспериментальных методов, применяемых во всех областях фундаментальных и прикладных наук, которые требуют информации о свойствах вещества на молекулярном уровне, является масс-спектрометрия. Отмеченные во введении тенденции ярко проявились в ее эволюции от сложного и малораспространенного вида эксперимента в атомной и ядерной физике [2-4] до общедоступного и широко применяемого высокоинформативного метода исследований [3-66].

Прогресс техники биомедицинского масс-спектрометрического эксперимента ...

Масс-спектрометрия как метод точного измерения масс атомов и молекул основана на разделении ионизированных частиц с разным отношением массы m к заряду z в магнитном и электрическом полях. Практическая реализация данного метода определяет состав масс-спектрометрической экспериментальной установки или коммерческого прибора. Принципиальными блоками являются система ввода образца, источник ионов для перевода образца в ионизированное состояние, масс-анализатор, где собственно и происходит разделение ионов в соответствии с m/z , система детектирования и регистрации. Компьютеризированная система управления необходима для осуществления автоматизированного управления работой прибора и проведения сбора, обработки и хранения данных. История развития метода связана с качественным и количественным совершенствованием параметров перечисленных составляющих масс-спектрометрической установки.

В истории становления масс-спектрометрии достаточно ярко проявилась общая тенденция неразрывной связи развития науки с запросами и потребностями развития человеческого общества. Основные этапы этого пути отражены в схеме, представленной на Рис. 1.

Обнаружение физических принципов, легших в основу метода, приходится на период великих открытий в физике на рубеже XIX-XX в.в. К ним относятся открытия положительных ионов (1886 г.), катодных лучей, электрона (1897 г.) [2, 4]. Первый масс-спектр был получен Дж. Томсоном (J.J. Thomson) в 1912 г. на простой лабораторной вакуумной установке и зарегистрирован в виде парабол на флуоресцирующем экране [5]. Томсоном впервые были получены масс-спектры O_2 , N_2 , CO , CO_2 и открыты изотопы неона ^{20}Ne и ^{22}Ne . Первые лабораторные масс-спектрометрические установки были сконструированы А.Дж. Демпстером (A.J. Dempster, 1918) и Ф.В. Астоном (F.W. Aston, 1919) [4, 6]. Практически до середины века масс-спектрометрия оставалась методом фундаментальных физических исследований в ограниченном числе лабораторий. Печальным парадоксом истории XX-го века является то, что наиболее активное финансирование научно-технических разработок было связано с развитием военной техники. Методы разделения и исследования изотопов были востребованы при разработке ядерного оружия в период Второй мировой войны (изотоп урана ^{235}U выделен А.О. Ниром (A.O. Nier) в 1940 г.) и послевоенной гонке вооружений. В бывшем Советском Союзе первые масс-спектрометрические установки относились к засекреченным объектам [6], а в реферативных журналах метод масс-спектрометрии до сих пор находится в разделе «Ядерная физика». В тот же военный период возрастающая потребность боевой техники в топливе стимулировала исследования нефтеперерабатывающих компаний, в особенности в США, где первый коммерческий масс-спектрометр был создан для Atlantic Refinery Company [3, 4]. В послевоенные годы нефтяной бум, подъем химической промышленности, синтез новых материалов потребовали развития методов органического анализа [14, 16, 23, 29-32, 37, 39], но только очень богатые фирмы могли позволить себе дорогостоящие масс-спектрометры. Важным моментом в развитии масс-спектрометрии в США, по оценкам американских специалистов, явилась передача ряда первых уникальных масс-спектрометрических установок нефтяными компаниями в бюджетные университеты, что способствовало быстрому освоению и развитию метода широким кругом ученых. При переходе к мирной жизни многие военные разработки начали внедрять в гражданскую промышленность. После преодоления последствий Второй мировой войны в Европе большое внимание стало уделяться качеству жизни, развитию медицины, фармакологии, внедрению прогрессивных методов ведения сельского хозяйства и переработки продуктов питания. В связи с этим сформировался социальный заказ на развитие соответствующих областей науки и за достаточно короткий период в 70-80-е годы масс-спектрометрия из метода фундаментальных физико-химических исследований [8-14, 18-21, 26-35, 41-43] превратилась в эффективное средство биохимических, фармакологических, биомедицинских исследований [7, 23, 34, 36, 40, 44-46, 48-52, 54-59]. Окончание холодной войны в конце 80-х - начале 90-х годов XX-го века ознаменовалось резким сокращением расходов на оборонные научные исследования, однако положительной его стороной стала конверсия, и прогрессивно настроенная мировая научная общественность в полной мере воспользовалась открывшейся возможностью «перековать мечи на орала» и переключила накопленный научно-технический потенциал с задач военных на проблемы, связанные со здоровьем и благосостоянием человека [36, 4, 45, 49-51, 54, 55, 58, 59]. В связи с этим, в течение последнего десятилетия наблюдается своеобразный бум в развитии биомедицинской масс-спектрометрии. Кроме того, колоссальный прогресс науки в целом оказывает влияние на каждую из ее областей, и новые возможности тонких технологий и компьютеризация обеспечивают качественно новый уровень масс-спектрометрической техники. Отметим, что пять открытий, напрямую связанных с развитием или применением масс-спектрометрии, отмечены Нобелевскими премиями [45]: Дж. Дж. Томсон (1906), Ф.В. Астон (1922), В. Пауль (W. Paul, 1989), Р.А. Маркус (R.A. Markus, 1992), Г. Крото, Р.Е. Смолли, Р.Ф. Керл (G. Kroto, R.E. Smally, R.F. Curl, 1996).

Существенный прогресс масс-спектрометрии связан, в наибольшей степени, с эволюцией методов перевода молекул исследуемого вещества в газовую фазу в ионизированном состоянии. Именно эти два момента - необходимость перевода в газовую фазу без термической деградации и использование мягкого

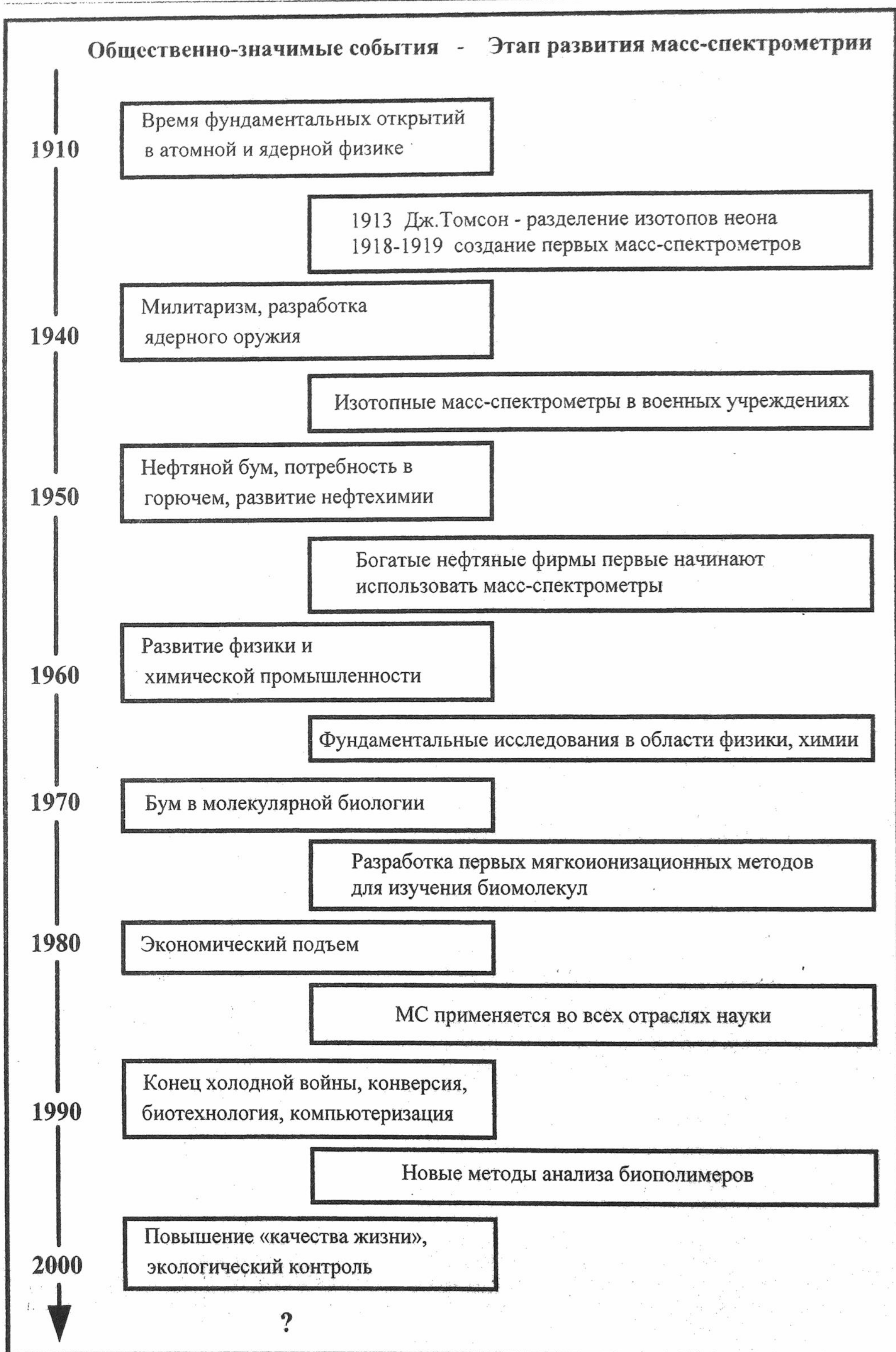


Рис. 1. Сопоставление эволюции потребностей общества и ответного развития одного из методов научных исследований - масс-спектрометрии.

(неразрушающего) способа ионизации, обеспечивающего минимальную фрагментацию - являлись основным камнем преткновения в приложении масс-спектрометрии к полярным, термолабильным соединениям [15, 17, 58, 62]. Творческий поиск именно в этом направлении вызвал большое оживление в масс-спектрометрическом сообществе, поскольку открывал перспективы апробации широкого круга эффектов, приводящих к переводу вещества в ионизированное состояние. В результате было предложено несколько десятков способов получения ионов, основанных на разнообразных физических принципах [6, 15, 17, 26, 32, 34-37, 39, 44-49, 55, 58, 59]. Названия основных методов ионизации на русском и английском языках суммированы в Табл. 1.

Практически одновременно разрабатывались два основных подхода: перевод нейтральных молекул в газовую фазу с последующей ионизацией и перевод вещества из конденсированного состояния в газовую фазу, сопровождающийся ионизацией (десорбционные и вторично-эмиссионные методы).

Исторически первым (с 1918 года [59]) в качестве метода ионизации использовали электронный удар (ЭУ), который продолжает оставаться в арсенале методов как наиболее эффективный в своей области применимости к газообразным и легколетучим веществам [7, 9, 18, 22, 29, 30, 37]. Легкость воспроизведения экспериментальных параметров ЭУ на любых установках обеспечивает возможность стандартизации, в связи с чем именно для ЭУ созданы компьютерные банки масс-спектров; на его основе установлены закономерности фрагментации для многих классов летучих органических и неорганических соединений [8, 21, 22, 29, 30, 32, 35, 53, 60]. Основными недостатками метода ЭУ по отношению к лабильным соединениям являются, во-первых, необходимость испарения образца и, во-вторых, так называемая «жесткость»: в ходе ионизации молекулы при ее столкновении с электроном со стандартной энергией 70эВ образуемому молекулярному иону передается энергия возбуждения в несколько электрон-вольт, что приводит к его интенсивной фрагментации.

Ко второму подходу относится метод распыления ионов из конденсированных образцов под воздействием высокоэнергетических (с энергией до нескольких десятков килоэлектронвольт) первичных ионов - вторично-ионная масс-спектрометрия (ВИМС) [27, 28, 35, 41]. Однако он также был достаточно жестким и применялся в основном в исследовании неорганических материалов - металлов и диэлектриков. Спектры ВИМС органических образцов удавалось получать из тонких пленок, однако спектры в большинстве своем были нестабильны из-за быстрого разрушения образца [35, 46, 63].

В связи с этим шел поиск более мягких, не разрушающих вещество, методов воздействия. Были предложены химическая ионизация (ХИ) (Ф.Х. Филд (F.H. Field), 1966) и фотоионизация (ФИ) [26, 32, 39]. Данные методы обеспечивали больший выход молекулярных ионов, однако также требовали испарения образца и были применимы лишь к отдельным группам веществ.

Важной вехой, обозначившей принципиальную возможность мягкой ионизации, явилась разработка Х.-Д. Бекки (H.-D. Beskey) метода полевой ионизации (ПИ) [33, 34], основанного на туннельном уходе электрона из молекулы, при котором энергия возбуждения не превышает десятых электронвольта [11, 15, 33]. Вторую проблему - неразрушающий способ перевода молекул в газовую фазу - удалось решить в рамках этого же способа ионизации путем принципиальной модификации способа ввода конденсированного образца - нанесения его непосредственно на поверхность полевых эмиттеров с развитой поверхностью типа микродендритов или вискероов [34, 57, 64]. Метод получил название полевой десорбции (ПД) (Х.-Д. Бекки, 1969 [64]) и с его помощью впервые были получены масс-спектры многих классов труднолетучих высокополярных соединений [34, 65, 66]. Недостатком ПИ и ПД явились не какие-либо их принципиальные ограничения, а сложность экспериментальной техники, в связи с чем они могли быть реализованы только в специализированных масс-спектрометрических лабораториях. Появление этих методов не только расширило область чисто аналитического применения масс-спектрометрии, но и позволило ставить и решать новые физико-химические и биофизические задачи фундаментального характера. Так, в Физико-техническом институте низких температур (ФТИНТ) НАН Украины на основе ПИ был разработан метод изучения термодинамических характеристик малых кластеров, в том числе ассоциатов биомолекул [62, 67-71], а метод ПД использовался при установлении молекулярных механизмов действия некоторых лекарственных препаратов [72, 73]. Несмотря на то, что новые методы ионизации в последнее время значительно потеснили ПД, она продолжает интенсивно использоваться в исследовании органических полимеров [74].

Вторая половина XX-го века отмечена быстрым внедрением научных разработок в промышленное производство, поэтому, как только была показана принципиальная возможность анализа термолабильных соединений с помощью метода масс-спектрометрии, встал вопрос о разработке сравнительно простых коммерческих приборов для контроля химико-технологических процессов, которые могли бы эксплуатироваться техническим персоналом без дорогостоящей подготовки. Важным шагом в этом направлении явилась разработка метода с бомбардировкой быстрыми атомами (ББА) [75-77]. Метод ББА можно рассматривать как развитие вышеназванного метода ВИМС [78], однако он перевел вторично-эмиссионные исследования на качественно новый уровень благодаря двум нововведениям: использова-

Таблица 1. Названия и соответствующие аббревиатуры, принятые в русскоязычной и англоязычной научной литературе, для методов получения ионов, применяющихся в органической и биомедицинской масс-спектрометрии

Название метода на русском языке	Аббре- виатура	Название метода на английском языке	Аббре- виатура	Ссылка
Электронный удар	ЭУ	Electron Impact	EI	[7, 16, 18, 22, 30]
Химическая ионизация	ХИ	Chemical Ionization	CI	[26, 32, 39]
Фотоионизация	ФИ	Photoionization	PI	[26]
Термическая ионизация	ТИ	Thermal Ionization (Thermal Desorption)	TI (TD)	[15, 16, 20]
Поверхностная ионизация	ПИ	Surface Ionization	SI	[10, 15]
Полевая ионизация	ПИ	Field Ionization	FI	[11, 33, 34]
Полевая десорбция	ПД	Field Desorption	FD	[34, 57, 66]
Вторично-ионная масс-спектрометрия	ВИМС	Secondary Ion Mass Spectrometry	SIMS	[28, 35, 41, 46]
Бомбардировка быстрыми атомами ¹	ББА	Fast Atom Bombardment	FAB	[17, 32, 59, 76]
Удар тяжелыми кластерами	-	Massive Cluster Impact	MCI	[59]
Захват электрона (дает отрицательные ионы)	-	Electron Capture	-	[13, 25]
Десорбционная химическая ионизация	ДХИ	Desorption Chemical Ionization	DCI	[32, 39]
Химическая ионизация при атмосферном давлении	ХИАД	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	APCI	[17, 45, 55]
Десорбция ионами высоких энергий	ДИВЭ	Heavy Ion Induced Desorption	HIID	[17, 74]
Плазменная десорбция осколками деления ²⁵² Cf	ПДМС	Plasma desorption ²⁵² Cf	PD ²⁵² Cf	[63, 88]
Лазерная десорбция	ЛД	Laser Desorption	LD	[17, 63]
Матричная лазерная десорбция/ионизация	МАЛДИ	Matrix Assisted Laser Desorption	MALDI	[45, 59, 87, 89]
Полевое испарение ионов из растворов	ПИИР	Electrohydrodynamic Ionization	-	[12, 17]
Экстракция ионов из растворов при атмосферном давлении	ЭРИАД	-	-	[17, 84]
Термоспрей, Ионоспрей		Thermospray, Ionspray	-	[17, 45, 83]
Электроспрей		Electrospray Ionization	ESI	[40, 44, 59, 87]

¹ Встречаются также варианты перевода английского названия: «Десорбция быстрыми атомами» и «Бомбардировка ускоренными атомами»

нию нейтральных бомбардирующих атомов и жидкой матрицы. Идея бомбардировки образца не ионами, а нейтральными атомами с целью избежания накопления зарядов на поверхности диэлектрика впервые была реализована советским исследователем Г.Д. Танцыревым [79], однако основное новшество, обеспечившее стремительное внедрение ББА в органический анализ и состоявшее в использовании жидкой матрицы из вязких жидкостей с низкой упругостью пара (в основном, глицерина), принадлежала М. Барберу (M. Barber, 1981) с соавторами [75], которые и считаются разработчиками ББА за рубежом. Данный метод оказался достаточно простым и быстро получил широкое распространение [36, 39, 49, 54, 55, 63, 76, 83]; коммерческие приборы, укомплектованные источниками ионов с ББА, нашли широкий рынок сбыта [80]. Метод ББА позволил в короткий срок проанализировать практически все классы органических соединений, попадающих в массовый диапазон примерно до 10^4 Да. Наряду с аналитическим применением, данный метод весьма активно начал использоваться как один из инструментов в молекулярно-биологических, фармакологических, биофизических, биомедицинских исследованиях для установления молекулярных механизмов различных биологических процессов [49-51, 54, 72, 81, 82].

Поскольку открылась возможность применения масс-спектрометрии в биомедицинских исследованиях, запросы ученых тут же возросли и, в частности, встал вопрос о приближении условий масс-спектрометрического эксперимента к, по крайней мере, модельным условиям биохимических опытов. Такая необходимость была обусловлена тем, что, если для сравнительно простых органических веществ переход между твердой, жидкой и газовой фазами в большинстве случаев не оказывает существенного влияния на структуру молекул, то для ставших доступными для масс-спектрометрического анализа биополимеров их взаимодействие с водно-гидратным окружением как средой функционирования играет весьма важную роль. В связи с этим некоторые нарушения нативной структуры биополимеров возможны уже на стадии пробоподготовки, включающей высушивание или перенос в вязкие матрицы. Поэтому следующим логическим шагом стал поиск подходов к распылению ионов из растворов. Было предложено несколько таких методов, среди которых можно отметить термоспрей (H.L. Vestal, 1980) [83], электроспрей (J.B. Fenn, 1984) [17, 44], советские разработки электрогидродинамической ионизации и полевого испарения ионов из растворов (ПИИР), (В.Е. Скурат, Н.Б. Золотой, Г.В. Карпов) [6, 12], экстракции ионов из растворов при атмосферном давлении (ЭРИАД), (Л.Н. Галль, М.Л. Александров) [12, 84, 85]. В 90-е годы все лучшие наработки этих методов были объединены в метод, получивший обобщенное название электроспрей [44], который в рекордно короткие сроки был внедрен в промышленное производство и обеспечил качественно новый уровень исследований: он сделал доступным изучение биополимеров, в частности, белков с молекулярным весом до 200 000 Да [55, 59, 86, 87].

Что касается распыления ионов из твердотельных образцов, в этой области также был достигнут значительный прогресс. В результате конверсии в прикладные исследования пришел метод плазменной десорбции осколками деления ^{252}Cf (ПлД ^{252}Cf) (R. MacFarlane, 1974) [63, 88], однако, в связи с опасностью работы с радиоактивными изотопами, он был вскоре вытеснен методом лазерной десорбции (ЛД) [17, 55]. Качественно новый уровень этого метода, также обеспечивший возможность анализа биополимеров, причем фактически без ограничений по молекулярному весу [45, 59], был достигнут благодаря разработке Ф. Хилленкампом (F.N. Hillenkamp, 1985) метода матричной лазерной десорбции/ионизации (МАЛДИ) [89]. Успех предложенного метода определялся оригинальным способом пробоподготовки: исследуемое вещество смешивалось с веществом-матрицей, характеризующимся эффективным поглощением лазерного излучения заданной длины волны. При воздействии лазером на такой образец достигалась высокая эффективность перевода больших биомолекул (до 150 000 - 300 000 Да [86]) в газовую фазу в ионизированном состоянии. Метод МАЛДИ быстро завоевал популярность в изучении различных типов высокомолекулярных соединений [87, 90-91], включая биополимеры.

Отдельно следует выделить серию методов ионизации, традиционно применяющихся в неорганическом анализе, большинство из которых включает разрушение (фактически сжигание) исходного образца. К ним можно отнести пиролитическую, термоионизационную, искровую масс-спектрометрию, метод индуктивно-связанной плазмы (inductively coupled plasma, ICP) [20, 45, 56]. Сильной стороной некоторых из названных методов является высокая чувствительность к ионам металлов; это свойство может быть востребовано при проведении экологического контроля и медицинской диагностики.

Анализ масс-спектрометрических работ, выполняемых в последние годы, позволяет заключить, что в настоящее время наиболее популярными и перспективными в молекулярно-биологических и биофизических исследованиях являются методы ионизации электроспрей и МАЛДИ, а в приложении к низкомолекулярным соединениям прочные позиции продолжает удерживать метод ББА. Сравнение основных параметров методов ионизации ЭУ, ББА, МАЛДИ и электроспрей приведено в Табл. 2.

Таблица 2. Сравнение параметров основных методов ионизации, используемых для анализа биомолекул (по данным [45, 59, 87]).

Метод ионизации	Массовый диапазон ¹	Чувствительность (моль)	Преимущества	Недостатки
ЭУ	~1000 (500)	10^{-15}	Легкая стандартизация и наличие надежных банков данных, широкое распространение, получение структурной информации	Высокие энергия возбуждения и степень фрагментации ионов; необходимость испарять образец; доступны летучие неполярные вещества
ББА	24 000 (7 000)	10^{-9}	Мягкость; простота и быстрота анализа, широкое распространение, достижимо высокое разрешение	Фон матрицы, эффект подавления, влияние солей, сравнительно низкая чувствительность; ограничения по массам, растворимости, полярности
МАЛДИ	>300 000 (150 000)	10^{-12} - 10^{-15}	Мягкость, анализ высокомолекулярных биополимеров и смесей, терпимость к примесям солей	Фон матрицы, малая точность, низкое разрешение, возможность фотодиссоциации веществ
Электро-спрей	~200 000 (70 000)	10^{-12} - 10^{-15}	Самый мягкий метод для анализа биополимеров и их комплексов; получение многозарядных ионов; легкая стыковка с ЖХ для анализа смесей и МС/МС для структурной информации; нет влияния матрицы	Проблемы со смесями; влияние солей; высокие требования к чистоте системы ввода

¹ Указан теоретически доступный и достигнутый на практике высший предел диапазона масс

Совершенствование основного блока масс-спектрометрических установок - масс-анализаторов - не имеет столь бурной истории, как описанное выше изобретение разнообразных источников ионов, однако оно также обеспечило качественный прогресс масс-спектрометрии [92, 45, 59]. В настоящее время существует четыре основных способа разделения ионов по массам и пять различных типов масс-анализаторов. Это магнитные и электростатические, радиочастотные (монопольные, квадрупольные), времяпролетные, анализаторы на принципе ионно-циклотронного резонанса (ИЦР) с фурье-преобразованием; близкими по принципу действия к ИЦР, но намного более простыми являются ионные ловушки. Необходимость сосуществования различных способов разделения по массам наиболее ярко описана в обзоре старейшего сотрудника известной фирмы-производителя масс-спектрометров Finnigan MAT К. Брюнне (С. Brunnee) «Идеальный масс-анализатор: факт или фикция?» [92]. Основная проблема состоит в том, что, используя только один из перечисленных выше принципов, невозможно создать масс-анализатор с оптимальным значением всех технических параметров, причем в балансе с приемлемой стоимостью прибора и измерений с его помощью. Поэтому выбор масс-анализатора при разработке или приобретении прибора определяется кругом объектов и задач, которые предстоит решать. Важные для такого выбора параметры масс-анализаторов приведены в Табл. 3.

На приборах с магнитными анализаторами традиционно проводятся самые разнообразные физико-химические исследования и тонкие эксперименты с хорошим разрешением, однако доступный массовый диапазон и время сканирования спектров определяются параметрами используемого магнита и имеются повышенные требования к вакууму в системе. Преимуществом радиочастотных анализаторов является легкость автоматизации управления и регистрации, сравнительная простота и дешевизна приборов.

Прогресс техники биомедицинского масс-спектрометрического эксперимента ...

Приборы с ИЦР отличаются высокой сложностью и дороговизной, однако предоставляемая ими, а также ионными ловушками, возможность удерживать частицы в ионизированном состоянии достаточно длительное время делает их перспективными в исследованиях долгоживущих ионов и их взаимодействий с другими частицами. Хорошая сочетаемость времяпролетных анализаторов с перспективным методом МАЛДИ обеспечила повышенный интерес к ним в последние годы. Их преимуществами являются практически неограниченный диапазон масс и высокая скорость регистрации спектра, а основным недостатком - низкая разрешающая способность линейного типа анализатора. Для преодоления этого недостатка в настоящее время используются так называемые масс-рефлектроны и ведется поиск других инженерных решений для повышения разрешения.

Таблица 3. Сравнение основных параметров различных типов масс-анализаторов
(по данным [45, 59, 92])

Тип масс-анализатора Параметр	Магнитный	Квадрупольный	Время-пролетный	Ионная ловушка	ИЦР
Массовый диапазон, Да	20 000 (средний)	3000 (низкий)	неограничен	2000 (низкий)	10 000 (средний)
Разрешение	10 000 (высокое)	2000 (среднее)	350 (низкое) (1500 с рефлектроном)	1500 (среднее)	500 000 (очень высокое)
Скорость сканирования	низкая	высокая	очень высокая	высокая	очень высокая
Простота	сложный	простой	простой	простой	сложный
Стоимость	высокая	низкая	низкая	низкая	очень высокая

Одним из эффективных приемов улучшения параметров масс-спектрометра, в том числе существенного повышения разрешения, является последовательное соединение нескольких масс-анализаторов в тандем, откуда происходит название **тандемная масс-спектрометрия**, обозначаемая также, в зависимости от числа анализаторов, МС/МС или МСⁿ [38, 42, 43, 48]. По некоторым оценкам, использование тандема в 1000 раз повышает информативность метода [22], так как оно позволяет выбирать отдельные первичные ионы (молекулярные, фрагментные, кластерные) и последовательно изучать их дальнейшую фрагментацию, получая таким образом информацию о структуре и об энергетике процесса распада исходного иона [32, 43, 45]. У ионов сравнительно стабильных молекул и комплексов уровень самопроизвольного (метастабильного) распада может быть невысок, в связи с чем для увеличения степени фрагментации первичных ионов между масс-анализаторами помещают так называемую ячейку столкновений, в которую напускают инертный газ. Данный прием получил название **столкновительно-индуцированной диссоциации** (СИД, «collision induced dissociation», CID в английской и «collision activated dissociation», CAD в американской научной литературе), [38, 42, 45]. Различные варианты тандемной масс-спектрометрии используются в исследованиях структуры биомолекул.

Что касается системы **регистрации ионов**, то в настоящее время используются в основном вторичные электронные умножители различных типов и микроканальные пластины [20, 59]. Существенным недостатком многих детекторов является дискриминация по массам, и верхний предел чувствительности ограничен миллионом дальтон.

Бурный прогресс техники масс-спектрометрического, равно как и многих других методов научных исследований, обусловлен общим прогрессом науки в целом и массовой разработкой новых технологий. Весьма своевременным здесь оказалось развитие **компьютерной техники**. Естественно, как и в других областях, внедрение автоматизированных методов управления экспериментальной установкой, сбора и обработки данных позволило на несколько порядков увеличить производительность и информативность масс-спектрометрического анализа. Кроме того, само функционирование приборов с времяпролетными масс-анализаторами и ИЦР практически невозможно без компьютеризации. Механическая регистрация спектров в большом диапазоне масс и «ручная» обработка спектров в принципе невозможны в реальном

масштабе времени. Современные информационные технологии, создание компьютеризированных банков масс-спектров и баз данных, доступных через Интернет, значительно облегчает и ускоряет поиск и идентификацию неизвестных соединений.

Важным направлением является также сочетание масс-спектрометров с другими видами исследовательских приборов, в частности, с хроматографами различных типов [23, 31, 32, 39]. Возможность проводить анализ компонентов разделяемых смесей в режиме реального времени («on line») значительно повышает эффективность как масс-спектрометрической, так и хроматографической техники. Сочетание масс-спектрометров с газофазными методами ионизации с газовыми хроматографами было осуществлено достаточно легко (F.W. McLafferty, 1956 [59]), а сочетание с жидкостными хроматографами удалось реализовать лишь двумя десятилетиями позже [61]. Совершенствование техники хроматографии привело к разработке метода высокоэффективной жидкостной хроматографии, которая была успешно соединена с методом электроспрея (наноспрей). Эффективным является также сочетание с устройствами для капиллярного зонного электрофореза.

Из приведенного обзора следует, что в настоящее время сняты практически все ограничения на агрегатное состояние, химический тип, массу исследуемых соединений. Возможность регистрации очень больших масс лимитируется на данном этапе только реально достигнутыми параметрами различных типов масс-анализаторов и регистрирующих устройств.

Отметим, что метод масс-спектрометрии по распространенности в научных исследованиях и промышленном контроле занимает третье место после спектральных и хроматографических методов. Место это определяется по экономическому показателю объема продаж соответствующих приборов. По оценкам американского бюро «Scientific Directions International» [45] непрерывно растущий объем продаж масс-спектрометрической техники составлял: \$ 579 000 000 в 1990 г., \$ 1 100 000 000 в 1995 г. и \$ 1 300 000 000 в 1998 г. Производством масс-спектрометров и комплектующих к ним занимается в настоящее время более сотни различных фирм, списки которых регулярно публикуются [80].

ОСНОВНЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ

В МОЛЕКУЛЯРНО-БИОЛОГИЧЕСКИХ И БИОФИЗИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

Описанию разнообразнейших применений метода масс-спектрометрии в молекулярно-биологических, медицинских, фармакологических исследованиях посвящено значительное количество ежегодно публикуемых обзоров и монографий [3, 7, 32, 34, 36, 39, 40, 44-46, 48-52, 54-59, 62, 73, 76, 84, 86-89]. В рамках краткого обзора даже простое перечисление наиболее значимых результатов практически невозможно, поэтому мы ограничили нашу задачу общей оценкой основных наиболее перспективных на сегодняшний день направлений приложения метода масс-спектрометрии в биологии.

1. Изначальным предназначением метода масс-спектрометрии было и остается простое «взвешивание» молекул, то есть определение их молекулярной массы. Описанная в предыдущем разделе гонка за «взятием наибольшего веса» увенчалась успехами, о которых еще два десятилетия назад исследователи не решались даже мечтать. Выражаясь более точно, на ранних этапах не было уверенности в существовании физических механизмов, которые бы позволили перевести в газовую фазу в стабильном состоянии молекулы нелетучих, термически нестабильных, сравнительно больших биомолекул и биополимеров. Благодаря становлению методов электроспрея и МАЛДИ в настоящее время удается регистрировать молекулярные ионы белков, нуклеиновых кислот, углеводов, органических полимеров с массами до нескольких сотен тысяч дальтон (см. Табл. 2). Отметим одну из интересных возможностей регистрации высоких масс: обнаружившаяся в методе электроспрея возможность получения многозарядных ионов $M \cdot H_n^{n+}$ (с n до нескольких десятков) позволяет регистрировать высокомолекулярные соединения на приборах со сравнительно небольшим диапазоном масс, поскольку отношение m/z уменьшается с возрастанием $z=n$.

В качестве примера можно привести некоторые значения масс биополимеров, исследовавшихся в последнее время. С помощью МАЛДИ зарегистрирован иммуноглобулин человека с массой 982 000 Да, с помощью электроспрея - гликопротеин из класса моноклональных антител со средней массой $149\,599 \pm 12$ Да в виде многозарядных ионов вплоть до $n = 72$ [59]. Для нуклеиновых кислот методом электроспрея изучались олигонуклеотиды, содержащие до 14 оснований; методом МАЛДИ - одонитевые олигонуклеотиды из 10-67 оснований; рекорд составили олигонуклеотиды из 150 оснований всех четырех типов, поли-А длиной в 420 оснований, поли-Г - в 130 оснований [87]. Отмечается, что большие молекулы нативной ДНК, имеющие длину более 8 мкм, разрываются гидродинамическими силами во время испарения, что делает принципиально невозможным их детектирование в интактном виде [87].

Точность определения массы с помощью метода электроспрей составляет $\pm 0,01\%$, с помощью МАЛДИ - $\pm 0,01-0,1\%$. При использовании МАЛДИ в сочетании с линейным времяпролетным масс-спектрометром разрешающая способность составляет в среднем всего 150-500, а при переходе к рефлектрону повышается до 2000. Среднее разрешение при использовании электроспрея в сочетании с магнитными и квадрупольными масс-анализаторами составляет 2000, а с ИЦР анализаторами оно достигает 160 000 [45, 59, 87].

2. Основным применением масс-спектрометрии по общему объему выполняемых работ остается аналитическое приложение, то есть идентификация разнообразных веществ. Важным достижением в этой области является разработка подходов к идентификации веществ, образующихся в различных процессах, в режиме реального времени. Выше уже отмечалась возможность «on-line» контроля разделения смесей методами жидкостной хроматографии. Перспективным является прямой контроль за превращениями в ходе химических и биохимических реакций; в качестве примера можно привести успешные попытки мониторинга процессов энзиматического расщепления белков. Что касается количественного анализа, то его методики при использовании мягкоионизационных и десорбционных методов весьма трудоемки, не отличаются высокой точностью и требуют дальнейшего усовершенствования.

3. Важной задачей молекулярной биологии является установление порядка мономеров в биополимерах - так называемое секвенирование. Наиболее значимым в международном масштабе проектом в этой области являлась расшифровка генома человека. Масс-спектрометрические методики используются на различных этапах установления первичной структуры биополимеров. Наряду со сравнительно простой задачей идентификации мономеров или олигомеров, выделенных соответствующими химическими методами, разрабатываются подходы к полному решению задачи секвенирования в рамках единого масс-спектрометрического эксперимента. С этой целью отрабатываются методики «дробления» биополимеров непосредственно в масс-спектрометрической установке с использованием метода столкновительно-индуцированной диссоциации и автоматизированные методы восстановления первичной структуры на основании анализа типов образующихся фрагментов [40, 44, 45, 59].

4. После первой эйфории от открывшейся возможности переводить молекулы биополимеров в газовую фазу остро встал вопрос о том, какую же еще информацию кроме данных о молекулярной массе можно получать из масс-спектрометрических экспериментов. Один из вопросов, имеющих фундаментальное значение, относится к конформации биомолекул: возможно ли сохранение вторичной, третичной, структуры биополимеров при переводе их из раствора в газовую фазу и потере гидратной оболочки. На примере ряда белков удалось показать, что при соблюдении определенных условий глобулярные белки в газовой фазе сохраняют свою глобулярную структуру, что само по себе является весьма интересным фактом [3, 4, 59]. Для решения задачи различения свернутой, компактной и развернутой, разупорядоченной структур биополимеров по определенным различиям в параметрах их масс-спектров в настоящее время используются три основных подхода: сравнение подвижности ионов, анализ многозарядных протонированных ионов и особенностей дейтерообмена и анализ метастабильного распада многозарядных ионов [44, 45, 59]. В рамках первого метода - ионной подвижности - сравнивается время движения ионов одного и того же вещества (то есть имеющих одинаковую массу), находящихся в различных конформациях, в сравнительно плотной газовой среде; показано, что время движения развернутых молекул за счет торможения на доли миллисекунд превышает время, характерное для глобулярных структур. Во втором методе сравнивается зарядовое состояние ионов, определяемое количеством присоединяющихся протонов: у молекулы в свернутой конформации число протоноакцепторных центров на поверхности, как правило, меньше, чем у молекулы в развернутом линейном состоянии. Третий метод наиболее сложен, так как требует использования tandemных масс-спектрометров и трудоемких калибровок; он был предложен ранее для простых органических ионов [42, 43], а в приложении к биополимерам находится в настоящее время в стадии разработки [93]. В основу метода положено измерение кинетической энергии, высвобождающейся при распаде двух- или многозарядного иона; полагается, что эта энергия практически равна энергии кулоновского отталкивания между заряженными центрами. Зная места локализации зарядов в ионе и энергию, можно легко оценить расстояние между зарядами и по их удаленности сделать вывод о конформации лежащего между ними участка цепи полимера.

5. Еще одной интересной задачей, как с точки зрения фундаментальной биофизики, так и практики является изучение невалентных межмолекулярных взаимодействий биомолекул. В 70-80 е годы такая постановка задачи была достаточно экзотической в силу того, что не был решен вопрос о сохранении в газовой фазе в неразрушенном состоянии отдельных молекул, не говоря уже об их ассоциатах, стабилизированных слабыми невалентными взаимодействиями. Уникальными в этом плане являлись исследования термодинамических характеристик взаимодействия компонентов нуклеиновых кислот друг с другом, с водой, с некоторыми биологически активными соединениями с использованием метода температурно-зависимой ПИ масс-спектрометрии [62, 67-71]. Исследование ассоциатов биологически активных соединений стало общедоступным после совершенствования различных десорбционных

методик [90, 91, 94]. Значительный прогресс в этой области стал возможным, опять таки, благодаря развитию метода электроспрей. Качественно новый уровень был достигнут после сравнительно быстрого конструктивного решения казавшейся практически невыполнимой задачи сочетания способа получения ионов электроспреем с масс-анализаторами типа ИЦР, а также развитием техники tandemного эксперимента, например, созданием тройных квадрупольных приборов. С помощью такого аппаратного обеспечения в настоящее время исследуются комплексы разнообразных биомолекул. Рассматривается стабильность четвертичной структуры белков, построенных из нескольких субъединиц, связанных невалентными взаимодействиями, например, инсулина. С помощью метода электроспрей зарегистрированы нековалентно связанные димеры алкогольдегидрогеназы из печени лошади (80 000 Да), тетрамеры алкогольдегидрогеназы дрожжей (147 000 Да) и пируваткиназы из мускулов кролика (232 000 Да) [87].

Идет поиск путей изучения молекулярного узнавания: белок-белкового (фермент-субстрат), белок-нуклеинового, антибиотик-молекулярный рецептор бактериальной клетки. Устанавливаются молекулярные механизмы действия лекарственных веществ. Среди новых подходов можно отметить определение скоростей протонного обмена и дейтерозамещения с использованием возможностей метода ИЦР. Идея приема состоит в том, что при образовании комплексов посредством водородных связей часть подвижных протонов полностью или на некоторое время выбывает из процесса обмена, и по определенным характеристикам этого процесса можно делать выводы о структуре комплексов. Оригинальным подходом является также изучение влияния изменения некоторых физических условий метода электроспрей - температуры, электрического потенциала на распыляющем капилляре - на стабильность и распад комплексов; метод находится в стадии разработки и от него в будущем ожидается возможность оценки термодинамических параметров взаимодействий в комплексах сравнительно больших биополимеров.

В рамках органической химии подобные исследования относятся к области быстро развивающейся и направленной на создание новых типов соединений супрамолекулярной химии; в рамках физико-химических исследований изучение высокоразмерных кластеров органических и неорганических соединений также представляет самостоятельную достаточно большую область [95, 96].

6. Важным для медиков и фармакологов является разработка методов прямого мониторинга процессов в живом организме как с целью диагностики, так и изучения процессов метаболизма тестируемых лекарственных препаратов в организме лабораторных животных. Для этого разрабатывается специальный класс приборов с мембранным вводом. Полупроницаемая мембрана должна обеспечить перекачку определенных органических соединений из раствора в газовую фазу. Мембранный интерфейс устанавливается на трубке, через которую прокачивается жидкость, например, кровь лабораторных крыс, которым был введен некий препарат, что позволяет в режиме реального времени контролировать превращения препарата непосредственно в живом организме. Приборы с мембранным вводом также весьма эффективны и перспективны в экологическом контроле для анализа воды; на их основе разрабатываются портативные полевые приборы.

7. Продолжается поиск подходов, которые бы позволяли, с одной стороны, сохранять биомолекулы в среде их функционирования и, с другой стороны, повышать чувствительность анализа. В рамках многих методик к водным растворам биомолекул приходится добавлять органические растворители и кислоты, токсичные для живых организмов в природных условиях. С целью удержания биомолекул в водной среде был опробован метод МАЛДИ с водным льдом в качестве матрицы [97-100]. Эксперименты были трудоемки, результаты плохо воспроизводились, и лишь в нескольких случаях удалось получить молекулярные ионы биополимеров из замороженных растворов. Так, в работе [97] в газовую фазу были переведены молекулы ДНК с массой около 6 МДа, содержащие до 9400 пар оснований. Поскольку столь тяжелые ионы уже невозможно зарегистрировать с помощью вторично-электронных детекторов (см. также пункт 9), идентификация собранной на коллекторе ДНК была выполнена с помощью электрофо-реза.

На данном этапе низкотемпературная масс-спектрометрия не оправдала себя в области аналитики, однако, в ряде работ была обоснована возможность ее использования в криобиологических и экологических исследованиях [101-106]. Было показано, что по типам ионов-ассоциатов, регистрируемых в низкотемпературных вторично-эмиссионных (ББА/ВИМС) масс-спектрах замороженных растворов биомолекул, можно делать выводы о характере связей биомолекул с ионами металлов и молекулами растворителя в конденсированном состоянии при низких температурах, исследовать молекулярные механизмы криоповреждений и оценивать положительное влияние криопротекторов. Метод эффективен также в идентификации неорганических загрязнений водного льда [106], что может быть использовано в экологическом контроле.

8. Разрабатываются подходы анализа не только отдельных молекул, но и реальных биологических объектов - клеток и тканей - с использованием различных десорбционных методов, в основном ВИМС и ЛД. В силу психологии человеческого восприятия, большой интерес представляет визуализация

(«imaging») результатов эксперимента, для чего применяется так называемое картирование («mapping») объектов [107]. Суть подхода состоит в сканировании ионизирующим пучком (ионов или лазерного излучения) макроскопического образца биоматериала, регистрации в каждой точке, в зависимости от задачи, либо полного спектра, либо выбранных ионов и последующего построения карты объекта с указанием пространственного распределения различных веществ. Такой подход весьма трудоемок, однако за рубежом исследования в данном направлении достаточно активно финансируются медиками, поскольку от них ожидается разработка новых эффективных методов диагностики, например, прямое установление накопления и распределения вредных веществ, ионов тяжелых металлов в организме, подвергшемся неблагоприятным воздействиям внешней среды, сравнение распределения различных веществ в тканях в норме и патологии. В качестве любопытной демонстрации возможностей метода на одной из конференций было представлено изображение распределения веществ в теле муравья, подвергнутого масс-спектрометрическому картированию [108].

9. Тему анализа макроскопических биообъектов продолжает исследование бактерий и вирусов. Задача быстрого экспресс-анализа и идентификации возбудителей различных заболеваний продолжает оставаться актуальной для быстрого установления причины инфекционного заболевания и наискорейшего подбора необходимого метода лечения, поскольку существующие микробиологические методы посева дают результат за время порядка дней. В этой области также достигнут определенный прогресс. Следует обратить внимание на качественно иную идеологию использования масс-спектрометрического метода для таких сложных систем. Ясно, что сложные масс-спектры, полученные не только для клеток, но и просто для неразделенных смесей молекул, практически невозможно расшифровать, и такая задача в принципе не ставится. Однако общий характер спектра должен воспроизводиться для схожих объектов, и их отнесение можно производить, используя компьютеризированный подход распознавания образов. Описанная методология была предложена еще в 70-е годы в применении к методике пиролизической масс-спектрометрии, включающей быстрое сжигание бактериальных клеток (и любого биоматериала) с последующей ионизацией образующегося набора продуктов пиролиза посредством ЭУ или ПИ. На этом этапе метод не получил особого распространения, скорее всего, в связи с низким уровнем компьютерной техники, не обеспечивавшей возможности работы с большими базами данных. В последние годы этот метод возрождается на новом уровне с использованием возможностей ЛД; основная проблема состоит в создании банка данных и разработке надежных алгоритмов отнесения различных классов бактерий по характеристическим спектрам [109, 59].

Современные возможности электроспрея позволяют переводить в газовую фазу и подвергать разделению по массам не только отдельные макромолекулы, но и такие простейшие биообъекты как вирусы [59]. В то время как задача разделения таких масс стала практически выполнимой, существенные затруднения возникают с современными детектирующими устройствами, которые в принципе не чувствительны к ионам с массой более миллиона дальтон. В связи с этим разделенные вирусы собирали на коллекторные пластины и идентифицировали с помощью электронной микроскопии. Весьма примечательно, что вирусы, прошедшие через масс-спектрометр, полностью сохраняли свою структуру, что указывает на сохранение четвертичной структуры биополимеров в газовой фазе и на возможность выживания вирусов в условиях космического пространства [59].

10. Описанные исследования находятся «на уровне искусства» («state-of-the-art»), однако, как показывает пример того же метода электроспрея, который в течение ряда лет рассматривался как не более чем экзотическая идея, при наличии спроса на какой-либо метод современный технологический уровень позволяет в короткие сроки довести до промышленного выпуска практически любую оригинальную разработку.

В настоящее время на базе масс-спектрометров с МАЛДИ создается новое поколение приборов для медицинской диагностики, называемых клиническими молекулярными сканерами (clinical molecular scanners) [110, 111]. Фундаментальной основой разрабатываемого метода диагностики является формирующаяся в последние годы новая дисциплина - протеомика (proteomics) - предмет которой является установление всей совокупности белков (протеома, proteome), характерной для каждого вида живых организмов. Предполагается, что молекулярные сканеры позволят проводить экспресс-анализ белкового состава клеток и тканей и на его основе делать заключения о наличии или отсутствии в организме тех или иных патологий. Процедура высокоскоростного и высокоэффективного анализа смеси белков, выделенных из биоматериала, состоит из последовательных шагов разделения смеси двумерным гель-электрофорезом, энзиматического гидролиза, переноса веществ с геля на специальную подложку-мембрану, сканирования этой подложки посредством МАЛДИ, идентификации белков в МАЛДИ-спектрах по принципу «отпечатков пальцев» с использованием соответствующих банков данных [110, 111].

Таким образом, возможности дальнейшего развития метода масс-спектрометрии и разработки новых подходов для решения разнообразнейших биологических задач практически не ограничены и составляют перспективное направление деятельности для исследователей различных специальностей.

ОСОБЕННОСТИ БИБЛИОГРАФИЧЕСКОГО ПОИСКА

В связи с широкой распространенностью метода масс-спектрометрии и, соответственно, огромным объемом получаемой с его помощью научной информации, в современных условиях особенно резко встает вопрос информационного поиска [112-114]. Основные монографии, посвященные различным вопросам техники и приложений масс-спектрометрии, уже были перечислены выше [6-62]. Этот список практически ежегодно пополняется несколькими монографиями [114, 115], в которых отражаются последние достижения метода. Текущая информация публикуется в восьми, по состоянию на 1999 г., специализированных журналах:

«*International Journal of Mass Spectrometry*» (до 1998 - «*International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes*», до 1983, по 53-й том включительно - «*International Journal of Mass Spectrometry and Ion Physics*»; выходит по несколько томов в год, некоторые тома не подразделяются на номера);

«*Journal of Mass Spectrometry*» (объединивший в 1995 г. журналы «*Organic Mass Spectrometry*» и «*Biological Mass Spectrometry*», ранее называвшийся «*Biomedical and Environmental Mass Spectrometry*»);

«*European Mass Spectrometry*»; «*Journal of the American Society for Mass Spectrometry*»;

«*Journal of the Mass Spectrometric Society of Japan*» (журналы, курируемые масс-спектрометрическими обществами различных стран);

«*Rapid Communications in Mass Spectrometry*» (для ускоренных публикаций);

«*Mass Spectrometry Reviews*» (обзоры);

«*Mass Spectrometry Bulletin*» (реферативный журнал).

Также регулярно издаются сборники трудов международной конференции по масс-спектрометрии, проходящей раз в три года (очередная, 15-я, состоялась в 2000 году в Барселоне), объединенные названием «*Advances in Mass Spectrometry*», и сборники трудов ежегодной конференции Американского масс-спектрометрического общества «*Proceedings of the nth ASMS Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics*»

В настоящее время, в связи с развитием компьютерной техники и электронных средств коммуникации, в практику начинают входить электронные версии практически всех журналов; тезисы многих конференций публикуются в сети Интернет; там же помещаются тексты учебных пособий по масс-спектрометрии, фирмы-производители размещают описание своих приборов и конкретных методик [113].

В Интернет открыты специализированные страницы по масс-спектрометрии, например:

<http://www.base-peak.wiley.com>, <http://www.hdsience.com>, <http://www.asms.com> с выходом на журналы, монографии, базы данных отдельных лабораторий, банки масс-спектров [113, 114]. В ряде зарубежных публикаций уже начинают давать ссылки не на печатные источники, а на адреса электронных публикаций в сети Интернет [113]. Также приобретает распространение публикация материалов на лазерных компакт-дисках: так, материалы очередного 14-го тома трудов международных масс-спектрометрических конференций были опубликованы в виде отдельного тома [3] и тома на CD-диске. В связи с этим возникают некоторые сложности с цитированием литературных источников и необходима разработка в самое ближайшее время правил ссылок на электронные научные публикации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По оценкам зарубежных специалистов, масс-спектрометрия в настоящее время занимает лидирующее положение среди всех других экспериментальных методов по темпам развития [45]. Из приведенного обзора следует, что в настоящее время сняты практически все ограничения на агрегатное состояние, химический тип, массу исследуемых соединений. Основным достижением совместных усилий исследователей, инженеров и производителей масс-спектрометрической техники в последнее десятилетие стало обеспечение возможности исследовать с помощью метода масс-спектрометрии большие биомолекулы и биополимеры. Успех этот был обеспечен в основном благодаря разработке и быстрому внедрению в промышленный выпуск методик электроспрей и МАЛДИ, а также совершенствованию техники время-пролетных, ИЦР, тандемных масс-спектрометров и, несомненно, широкому внедрению последних достижений компьютерной техники.

По оценкам наиболее перспективных направлений развития, выполненных специалистами американского агентства «*Strategic Directions International*», в области масс-спектрометрии дается следующий прогноз на ближайшие годы: в перспективных исследованиях в области биотехнологии наибольший успех ожидается для времяпролетного типа масс-спектрометров; ожидается также большой спрос для промышленного и экологического контроля на настольные приборы, сочетающие масс-

Прогресс техники биомедицинского масс-спектрометрического эксперимента ...

спектрометр и жидкостный хроматограф (МС/ЖХ) и портативные транспортабельные приборы для работы в полевых условиях [45].

В области фундаментальных молекулярно-биологических, биофизических, биотехнологических и медико-биологических исследований основными направлениями в настоящее время являются установление молекулярных механизмов разнообразных биологических процессов, в том числе их мониторинг в режиме реального времени, изучение структуры биополимеров в газовой фазе и процессов молекулярного узнавания, разработка методов медицинской диагностики и экологического контроля.

Благодарности. Работа выполнена при поддержке АО «SELMi» (ранее ПО «Электрон»), Сумы, в рамках задачи выработки перспективных направлений развития научного приборостроения, а также частично в рамках гранта INTAS-99-00478.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hoyningen-Huene P., Weber M., Oberheim E. Science for the twenty-first century. A new commitment. Background document of the World Conference on Science. Paris. Imprimerie Peltier, 1999. 40 p.
2. Гинзбург В.Л. // Успехи физич. наук. 1999. Т.169, N 4. С. 419-441
3. Advances in Mass Spectrometry / Ed. by E.J. Karjalainen, A.E. Hesso, J.E. Jalonen, U.P. Karjalainen. Amsterdam. Elsevier. 1998. V.14. 768 p.
4. Cooks R.G., Grill V., Bui H. A world of ions: from material modification to structural biology // Ibid. P.3-39
5. Griffiths I.W. // Rapid Commun. in Mass Spectrom. 1997. V.11, N1. P.2-16
6. Очерки истории масс-спектрометрии / Под ред. Г.А.Толстикова. Уфа. БНЦ УрО АН СССР. 1988. 158 с.
7. Анисимова О.С., Линберг Л.Ф., Шейнкер Ю.Н. Масс-спектрометрия в исследовании метаболизма лекарственных препаратов. М. Медицина, 1978. 168 с.
8. Вульфсон Н.С., Заикин В.Г., Микая А.И. Масс-спектрометрия органических соединений. М. Химия, 1986. 312 с.
9. Гэбрэлэу Н.В., Индричан К.М. Масс-спектрометрия координационных соединений. Кишинев. Штиинца, 1984. 340 с.
10. Зандберг Э.Я., Ионов Н.И. Поверхностная ионизация. М. Наука, 1969. 432 с.
11. Король Э.Н., Лобанов В.В., Назаренко В.А., Покровский В.А. Физические основы полевой масс-спектрометрии. К. Наук. думка, 1978. 196 с.
12. Масс-спектрометрия и химическая кинетика / Под ред. В.Л. Тальрозе. М. Наука, 1985. 342 с.
13. Мазунов В.А., Юмагузин Т.Х., Хвостенко В.И. Масс-спектрометрия резонансного захвата электронов: метод и ретроспективный обзор. Уфа. БФАН СССР, 1987. 219 с.
14. Масс-спектральный анализ смесей с применением ионно-молекулярных реакций / Под. ред. А.А. Поляковой. М. Химия, 1989. 240 с.
15. Поверхностные методы ионизации в масс-спектрометрии / Под ред. Г.А.Толстикова. Уфа. БНЦ УрО АН СССР. 1986. 71 с.
16. Полякова А.А. Молекулярный масс-спектральный анализ органических соединений. М.Химия, 1983. 248 с.
17. Скурят В.Е. Получение и исследование ионов нелетучих органических веществ в газовой фазе и в вакууме / Итоги науки и техники. Сер. Радиационная химия. Фотохимия. Т. 5. М. ВИНТИ, 1988. 176 с.
18. Сысоев А.А., Чупахин М.С. Введение в масс-спектрометрию. М. Атомиздат, 1977. 301 с.
19. Сысоев А.А. Физика и техника масс-спектрометрических приборов и электромагнитных установок. М. Энергоатомиздат, 1983. 256 с.
20. Сысоев А.А., Артаев В.Б., Кашеев В.В. Изотопная масс-спектрометрия. М. Энергоатомиздат, 1993. 288 с.
21. Тахистов В.В. Органическая масс-спектрометрия: термохимическое описание изомеризации и фрагментации ионов и радикалов в газовой фазе. Л. Наука, 1990. 222 с.
22. Терентьев П.Б., Станкявичус А.П. Масс-спектрометрия биологически-активных азотистых оснований. Вильнюс. Мокслас, 1987. 280 с.
23. Хмельницкий Р.А., Бродский Е.С. Хромато-масс-спектрометрия. М. Химия, 1984. 211 с.
24. Хмельницкий Р.А., Бродский Е.С. Масс-спектрометрия загрязнений окружающей среды. М. Химия, 1990. 184 с.
25. Хвостенко В.И. Масс-спектрометрия отрицательных ионов в органической химии. М. Наука, 1981. 160 с.
26. Физические основы масс-спектрометрии (методы ионизации) / Под ред. Г.А.Толстикова. Уфа. БНЦ УрО АН СССР, 1985. 120 с.
27. Черепин В.Т., Васильев М.А. Вторичная ионная эмиссия металлов и сплавов. К. Наук. думка, 1975. 239 с.
28. Черепин В.Т. Ионный микрозондовый анализ. К. Наук. думка, 1992. 344 с.
29. Будзикевич Г., Джерасси К., Уильямс Д. Интерпретация масс-спектров органических соединений. М. Мир, 1966. 354 с.
30. Джонстон Р. Руководство по масс-спектрометрии для химиков-органиков. М. Мир, 1975. 236 с.
31. Карасек Ф., Клемент Р. Введение в хромато-масс-спектрометрию. М. Мир, 1992. 237 с.
32. Чепмен Дж. Практическая органическая масс-спектрометрия. М. Мир, 1988. 216 с.
33. Beckey H.D. Field ionization mass spectrometry. Oxford. Pergamon Press, 1971. 315 p.
34. Beckey H.D. Principles of field ionization and field desorption mass spectrometry. Oxford. Pergamon Press, 1977. 335 p.
35. Benninghoven A., Rudenauer F.G., Werner H.W. Secondary ion mass spectrometry: basic concepts, instrumental aspects, applications and trends. New York. Wiley, 1987. 1226 p.

36. Biological mass spectrometry. Present and future / Ed. by T. Matsuo, R.M. Caprioli, L.M. Gross, Y. Seyama. Chichester. Wiley, 1994. 684 p.
37. Budzikiewich H., Djerassi C., Williams D.H. Mass spectrometry of organic compounds. San Francisco. Holden Day Inc., 1967. 690 p.
38. Busch K.L., Glish G.L., McLuckey S.A. Mass spectrometry/mass spectrometry: Techniques and applications of tandem mass spectrometry. New York. VCH Publ., 1989. 334 p.
39. Chapman J.R. Practical organic mass spectrometry. A guide for chemical and biochemical analysis, 2nd ed. Chichester. Wiley, 1995. 338 p.
40. Chapman J.R. Protein and peptide analysis by mass spectrometry. Totowa. Humana Press, 1996. 350 p.
41. Cherepin V. Secondary ion mass spectroscopy of solid surfaces. Utrecht. Science Press, 1987. 138 p.
42. Cooks R.G. Collision spectroscopy. New York. Plenum Press, 1978. 458 p.
43. Cooks R.G., Beynon J.H., Caprioli R.M., Lester G.R. Metastable ions. Amsterdam. Elsevier, 1973. 296 p.
44. Electrospray mass spectrometry: Fundamentals, instrumentation and applications / Ed. by Cole R.B. New York. Wiley, 1997. 578 p.
45. DeHoffmann E., Charette J. Stroobant V. Mass Spectrometry. Principles and applications. Chichester. Wiley, 1996. 340p.
46. Ion formation from organic solids / Ed by A. Benninghoven. Berlin: Springer-Verlag, 1983. 269 p.
47. Gas phase ion chemistry / Ed. M.T. Bowers. New York. Academic Press, 1979. V.1. 354 p.
48. Johnstone R.A.W., Rose M.E. Mass spectrometry for chemists and biochemists, 2nd ed. Cambridge. Cambridge Univ. Press, 1996. 502 p.
49. Mass spectrometry in biomedical research / Ed. by S.J. Gaskell. Chichester. Wiley, 1986. 492 p.
50. Mass spectrometry: clinical and biological applications / Ed. by D.M. Desiderio. New York. Plenum, 1992. V.1. 368 p.
51. Mass spectrometry: clinical and biological applications / Ed. by D.M. Desiderio. New York. Plenum, 1994. V.2. 254 p.
52. Mass spectrometry in environmental sciences / Ed. by F.W. Karasek. New York. Plenum, 1985. 578 p.
53. McLafferty F.W., Turecek F. Interpretation of mass spectra. 4th ed. Mill Valley. Univ. Sci. Books, 1993. 370 p.
54. Methods in Enzymology / Ed. by L.A. McCloskey. San Diego. Acadic Press, 1990. V.193: Mass spectrometry. 960 p.
55. NATO Adv. Study Inst. Series C: Phys. and math. sci. / Ed. by R.M. Caprioli, A. Malorni, G. Sindona. Dordrecht. Kluwer Acad. Publ., 1997. V.504. Selected topics in mass spectrometry in the biomolecular sciences. 586 p.
56. NATO Adv. Study Inst. Series C: Phys. and math. sci. / Ed. by K.R. Jennings. Dordrecht. Kluwer Acad. Publ., 1999. V.521. Fundamentals and applications of gas phase ion chemistry. 504 p.
57. Prokai L. Field desorption mass spectrometry. New York. Marcel Dekker Inc., 1990. 292 p.
58. Soft ionization biological mass spectrometry / Ed. H.R. Morris. London. Heyden, 1981. 166 p.
59. Siuzdak G. Mass spectrometry for biotechnology. San Diego. Academic Press, 1996. 162 p.
60. Watson J.T. Introduction to mass spectrometry. Philadelphia. Lapincott-Raven Publ., 1997. 496 p.
61. Yergey A.L., Edmonds C.G., Lewis I.A.S., Vestal L.M. Liquid chromatography/mass spectrometry. New York. Plenum Press, 1990. 316 p.
62. Взаимодействия биомолекул. Новые экспериментальные подходы и методы / Б.И. Веркин, И.К. Янсон, Л.Ф. Суходуб, А.Б. Теплицкий. К. Наук. думка, 1985. 164 с.
63. Demirev P.A. // Mass Spectrom. Rev. 1995. V.14, P. 279-308, 309-326
64. Beckey H.D. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 1969. V.2, N6. P.500-503
65. Schulten H.-R., Bahr U., Monkhouse P.B. // J. Biochem. Biophys. Meth. 1983. V.8. P.239-269
66. Schulten H.R., Lattimer R.P. // Anal Chem. 1989. V.61, N21. P. 1201A-1215A
67. Yanson I.K., Teplitsky A.B., Sukhodub L.F. // Biopolymers. 1979. V.18, N5. P. 1149-1170
68. Суходуб Л.Ф. Экспериментальные исследования межмолекулярных взаимодействий и гидратации нуклеотидных оснований, их метилпроизводных в различных агрегатных состояниях: Автореф. дис. докт. физ.-мат. наук: 03.00.02 / МГУ. Москва, 1985. 38 с.
69. Шелковский В.С. Энтальпии образования кластеров воды и гидратов нуклеотидных оснований в вакууме: Автореф. дис. канд. физ.-мат. наук: 01.04.14 / ФТИНТ АН УССР. Харьков, 1985. 17 с.
70. Sukhodub L.F. // Chem. Rev. 1987. V.87, N3. P. 589-606
71. Галетич И.К. Изучение термодинамических характеристик компонентов белково-нуклеиновых комплексов. Дис. канд. физ.-мат. наук: 03.00.02, Харьков, 1999. 202 с.
72. Косевич М.В. Молекулярный анализ лекарственных препаратов и продуктов их взаимодействия с ДНК и ее компонентами по данным мягкоионизационной масс-спектрометрии: Дис. канд. физ.-мат. наук: 01.04.14. Харьков, 1989. 180 с.
73. Sukhodub L.F. // Mass Spectrom. Rev. 1995. V.14, N4-5. P. 235-254
74. Schulten H.R., Lattimer R.P. // Mass Spectrom. Rev. 1983. V.3, N3. P.231-315
75. Barber M., Bordoli R.S., Sedgwick R.D., Tyler A.N. // J. Chem. Soc., Chem. Commun. 1981. N7. P. 325-327
76. Покровский В.А., Мосин В.В. // Теорет. и эксперим. химия. 1987. N1. С.62-78
77. Benninghoven A. // Int. J. Mass Spectrom. Ion Phys. 1983. V.46. P.459-462
78. Sunner J. // Org. Mass Spectrom. 1993. V.28. P. 805-823
79. Танцырев Г.Д., Клейменов Н.А. // Докл. АН СССР. 1973. Т.213, N3. С.649-652
80. Lammert S.A. 2000 Directory of mass spectrometer manufactures and suppliers // Rapid Commun. in Mass Spectrom. 2000. V.14, N9. P. 725-739
81. Аксенов С.А. Масс-спектрометрическое и квантово-химическое изучение неканонических пар нуклеотидных оснований: Дис. канд. физ.-мат. наук: 01.04.25. Сумы, 1996. 181 с.
82. Пашинська В.А. Взаємодії бісчетвертинних амонійових сполук з компонентами біологічних мембран: Автореф. дис. канд. фіз.-мат. наук: 03.00.02 / Харківськ. націон. університет. Харків, 2000. 19 с.

83. Vestal M.L. // *Mass Spectrom. Rev.* 1983. V.2, N4. P. 447-480
84. Галль Л.Н., Туркина М.Я. // *Успехи химии.* 1985. Т.54, вып.5. С. 741-764
85. Александров М.Л., Галль Л.Н. // *Докл. АН СССР.* 1984. Т.277, N2. P. 379-383
86. Senko M.W., McLafferty F.M. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 1994. V.23. P.763-785
87. Орлов В.М., Пустобаев В.Н., Маслова Р.Н. // *Молек. биол.* 1996. Т.30, вып.4. С. 759-772
88. Сундквист Б.У.Р. // *Биоорганич. химия.* 1991. Т.17, N10. С.1313-1328
89. Karas M., Bachmann D., Bahr U., Hillenkamp F. // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V.78. P.53-68
90. Smith R.D., Bruce J.E., Wu Q.Y., Lei Q.P. // *Chem. Soc. Rev.* 1997. V.26, N3. P.191-202
91. Cohen L.R.H., Strupat K., Hillenkamp F. // *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 1997. V.8, N10. P.1046-1052
92. Brune C. // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V.76, N2. P.125-237
93. Szilagyi Z., Vekey K., *Eur. Mass Spectrom.* 1995. V.1. P.507-518
94. Przybylski M., Glocker M.O. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1996. V.35, N8. P.805-826
95. Mark T.D. // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1987. V.79, N1. P. 1-59
96. Desfrancois C., Carles S., Scherman J.P. // *Chem. Rev.* 2000. V.100, N11. P. 3943-3962
97. Nelson R.W., Rainbow M.J., Lohr D.E., Williams P. // *Science.* 1989. V.246. P. 1585-1587
98. Nelson R.W., Thomas R.M., Williams P. // *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* 1990. V.4. P. 349-353
99. Williams P. // *Int. J. Mass Spectrom. Ion Proc.* 1994. V.131. P. 335-344
100. Belov M.E., Alimpiev S.S., Mlynski V.V., Nikiforov S.M., Derrick P.J. // *Rapid Commun. in Mass Spectrom.* 1995. V.9, N14. P.1431-1436
101. Боряк О.А., Косевич М.В., Шелковский В.С., Благой Ю.П. // *Биофизика.* 1996. Т.41, N6. С.1207-1213
102. Косевич М.В. // *Вісник Харківськ. Універ. Біофізичн. всник.* 1998. N422, вип. 2. С.5-14
103. Kosevich M.V., Boryak O.A., Shelkovsky V.S., Derrick P.J. // *Europ. Mass Spectrom.* 1998. V.4, N1. P.31-37
104. Kosevich M.V. // *Europ. Mass Spectrom.* 1998. V.4, N4. P.251-264
105. Косевич М.В. // *Проблемы криобиологии.* 1999. N2. С.54-64
106. Kosevich M.V., Shelkovsky V.S., Boryak O.A. // *SIMS XII, Proc. of the 12th Intern. Conf. on Secondary Ion Mass Spectrom., / Ed. by A. Benninghoven, P. Bertrand, H-N. Migeon, H.W. Werner.* 2000. Amsterdam. Elsevier. P.37-42
107. Chaurand P., Stoeckli M., Caprioli R.M. // *Anal. Chem.* 1999. V.71, N23. P. 5263-5270
108. Caprioli R. // *Proc. 17th Infom. Meeting on Mass Spectrom. Fiera di Primiero, Italy,* 1999. P.50
109. Pineda F.J., Lin J.S., Fenselau C., Demirev P.A. // *Anal. Chem.* 2000. V.72, N16. P. 3739-3744
110. Bienvenut W.V., Sanchez J.-C., Karmine A. et al. // *Anal. Chem.* 1999. V.71, N21. P.4800-4807
111. Binz P.-A., Muller M., Walther D et al. // *Anal. Chem.* 1999. V.71, N21. P.4981-4988
112. Lowes S., Rose M.E. Awareness in mass spectrometry: an evaluation of services for retrieving and abstracting // *Org. Mass Spectrom.* 1988. V.23, N7. P.535-542
113. Murray K.K. Internet resources for mass spectrometry // *J. Mass Spectrom.* 1999. V. 34. P.1-9
114. HD Science catalogue 1997. Mass spectrometry and chromatography publications and databases from one source. Nottingham. HD Sci. Ltd., 1997. 36 p.
115. *Methods in molecular biology.* V.146. Mass spectrometry of proteins and peptides / Ed. by J. R.Chapman. Totowa. Humana Press, 2000. 538 p.

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

УДК 577.3+519.2:616.006

НОВЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ СРЕДНЕГО ВРЕМЕНИ ТРАНЗИТА РАДИОФАРМПРЕПАРАТОВ В ПОЧКАХ

В. Г. Книгавко, В.Н.Лесовой, Е.Б.Радзишевская, Н.И.Пилипенко, А.В.Арсеньев, А.В.Книгавко

*Харьковский государственный медицинский университет, пр. Ленина, 4
Институт медицинской радиологии им. С.П.Григорьева АМН Украины, ул. Пушкинская, 82
9 октября 2000 г.*

В статье решается задача повышения информативности динамической радионуклидной диагностики. Используются методы моделирования процессов транспорта радиоактивного индикатора в организме человека. Предложен новый подход для определения среднего времени транзита радиофармпрепарата в почках. Предлагается трехдетекторная (для одной почки) и пятидетекторная (для двух почек) методика регистрации. Детекторы позиционируются над областью головного мозга, а также в зоне интереса спереди и сзади от пациента. Результаты измерений обрабатываются по методу наименьших квадратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: динамическая радионуклидная диагностика, математическое моделирование, транспорт радиофармпрепаратов, радионейрография.

В динамической радионуклидной диагностике для расчета среднего времени транзита радиофармпрепаратов (РФП) в органах ($\bar{t}$) используется [1, 2] формула

$$\bar{t} = \frac{S}{kA}, \quad (1)$$

где S - площадь под кривой зависимости скорости счета γ -излучения, создаваемого РФП, находящимся в исследуемом органе, от времени; A - активность препарата, прошедшего через орган; k - коэффициент пропорциональности между скоростью счета γ -излучения и активностью препарата, создавшего это излучение.

Практическое применение формулы (1) при радионейрографических исследованиях связано с необходимостью разрешения двух проблем. Первая из проблем состоит в том, что регистрируемое при радионейрографии излучение создается как РФП, захваченным выводящей системой почки (именно эта составляющая и нужна при вычислении $\bar{t}$), так и препаратом, находящимся в сосудах почки и окружающих почку тканях. Вторая проблема состоит в необходимости определения численного значения коэффициента k . Решению этих проблем при радионуклидном определении среднего времени транзита РФП в почке посвящена эта работа.

МАТЕМАТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ

Пусть $R(t)$ - скорость счета, регистрируемая над областью почки. Тогда

$$R(t) = R_n(t) + R_m(t), \quad (2)$$

где $R_n(t)$ - составляющая общей $R(t)$, созданная препаратом, захваченным выводящей системой почки, а $R_m(t)$ - составляющая, созданная препаратом, находящимся в тканях, окружающих выделительную систему почки (в поле зрения детектора). Предлагаемая методика выделения $R_n(t)$ из общей $R(t)$ представляет собой усовершенствование методики, описанной в [3]. Обычно считается, что в первые 1,5 - 2 минуты после введения РФП в организм препарат, захватываемый выводящей системой почки, не выводится из нее, а только накапливается. Тогда в это время величина $R_n(t)$ пропорциональна входной функции органа, которая, в свою очередь, пропорциональна концентрации препарата в крови, входящей в орган. Поэтому

$$R_n(t) = k_n \cdot \int_0^t c(t) dt, \quad (3)$$

где $c(t)$ - концентрация РФП в крови, рассматриваемая как функция от времени, а k_n - некоторый коэффициент пропорциональности.

Новый метод определения среднего времени транзита ...

В первые 1,5 - 2 минуты выходом препарата из сосудов в ткани еще можно пренебречь. Учитывая, что время транзита РФП в околопочечных сосудах (Δt) намного меньше характерных времен изменения величины $c(t)$, можно считать, что концентрация препарата на выходе из сосуда равна $c(t - \Delta t)$.

Величина $R_m(t)$ пропорциональна величине $\int_0^t c(t)dt - \int_0^t c(t - \Delta t)dt \approx c(t)\Delta t$. Поэтому для рассматриваемого интервала времени регистрации можно записать

$$R_m(t) = k_m \cdot c(t), \quad (4)$$

где k_m - некоторый коэффициент пропорциональности.

Теперь с учетом формул (3) и (4) запишем

$$R(t) = k_n \cdot \int_0^t c(t)dt + k_m c(t). \quad (5)$$

Кривая $c(t)$ обычно считается пропорциональной кривой клиренса крови, определяемой над сердцем. По причинам, о которых будет сказано далее, мы считаем более корректным использование вместо кривой клиренса, регистрируемой над сердцем, кривой зависимости скорости счета от времени, зарегистрированной над областью головного мозга ($R_m(t)$). Тогда можно записать

$$R(t) = k'_n \cdot \int_0^t R_m(t)dt + k'_m \cdot R_m(t), \quad (6)$$

где k'_n и k'_m - некоторые коэффициенты.

Регистрируя в первые 1,5 - 2 минуты кривые $R(t)$ и $R_m(t)$ (обычно со временем отсчета 10 - 12 секунд на точку), из зарегистрированных данных можно определить, используя метод наименьших квадратов, значения коэффициентов k'_n и k'_m .

Со временем препарат все больше переходит из сосудов в ткани. Поэтому ни кривую клиренса крови, регистрируемую над сердцем, ни кривую $R_m(t)$ нельзя при этом считать пропорциональной концентрации препарата в крови. В то же время вследствие существования гематоэнцефалического барьера выхода препарата в мозговую ткань не происходит и кривую $R_m(t)$ можно с хорошей точностью считать пропорциональной $c(t)$. Для решения задачи определения $\bar{t}$ необходимо исключить второе слагаемое в формуле (2). Для этого предлагается следующий подход.

Будем регистрировать излучение из области почки с помощью двух детекторов, один из которых расположен сзади от пациента, а другой - спереди. Пусть в дальнейшем индекс 1 относится к данным, полученным с использованием детектора, расположенного сзади, а индекс 2 - спереди.

Тогда

$$\begin{aligned} R_1(t) &= k'_{1n} \cdot \int_0^t R_m(t)dt + k'_{1m} \cdot R_m(t), \\ R_2(t) &= k'_{2n} \cdot \int_0^t R_m(t)dt + k'_{2m} \cdot R_m(t). \end{aligned}$$

Очевидно, что величина $k'_{2m} \cdot R_1(t) - k'_{1m} \cdot R_2(t)$ не содержит вклада, создаваемого препаратом, находящимся в тканях, окружающих выводящую систему почки. Очевидно также, что эта величина пропорциональна величине $R_n(t)$, т.е. скорости счета излучения, связанной с препаратом, захваченным выводящей системой почки. Пусть

$$R'_n(t) = k'_{2m} \cdot R_1(t) - k'_{1m} \cdot R_2(t). \quad (7)$$

Тогда в качестве величины S в формуле (1) можно принять

$$S = \int_0^\infty R'_n(t)dt. \quad (8)$$

Если бы препарат не выходил из лоханки почки (только накапливался бы в почке), то величина $R'_n(t)$ и при больших значениях t равнялась бы

$$R'_n(t) = (k'_{1n} \cdot k'_{2m} - k'_{2n} \cdot k'_{1m}) \cdot \int_0^t R_m(t)dt. \quad (9)$$

С другой стороны

$$R_n'(\infty) = kA \quad (10)$$

Тогда из формул (9) и (10) следует, что

$$kA = (k_{1n}' \cdot k_{2m}' - k_{2n}' \cdot k_{1m}') \cdot \int_0^{\infty} R_m(t) dt. \quad (11)$$

Подставляя теперь S и kA из формул (8) и (11) в формулу (1), окончательно получаем

$$\bar{t} = \frac{\int_0^{\infty} (k_{2m}' \cdot R_1(t) - k_{1m}' \cdot R_2(t)) dt}{(k_{1n}' \cdot k_{2m}' - k_{2n}' \cdot k_{1m}') \cdot \int_0^{\infty} R_m(t) dt}. \quad (12)$$

ВЫВОДЫ

Изложенная выше модель позволяет заключить, что, используя трехдетекторную (при определении среднего времени транзита в одной почке) или пятидетекторную (при определении $\bar{t}$ для каждой из почек) методики регистрации с расположением детекторов как это описано выше, обрабатывая результаты измерений по методу наименьших квадратов и проводя вычисления по формуле (12), можно определить такой диагностически важный показатель, как среднее время транзита РФП в почке (в почках).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Zierler K.L. Equations for measuring blood flow by external monitoring of radioisotopes // *Circulat. Res.* - 1965. - Vol. 14, № 2. - P. 605-617.
2. Вычисление моментов распределения времен транзита радиофармпрепаратов через органы по кривым активность-время / Книгавко В.Г., Пахомов В.И., Пилипенко Н.И.; ВНИИМИ. - 1983. - 78 с. // Анон. в ж. Медицинский реферативный журнал, № 10, 1983
3. Книгавко В.Г., Пахомов В.И., Клименко В.С. Расчет среднего времени транзита радиофармацевтических препаратов в почках // В сб.: Актуальные проблемы урологии и нефрологии. - Харьков, 1986. - С. 13-15.

УДК 621.373.826: 772.99

МЕТОДИ БІОФІЗИЧНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ГОЛОГРАФИЧЕСКОЙ ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ВЛИЯНИЯ ОЗОНОТЕРАПИИ НА ФОРМУ ЭРИТРОЦИТОВ КРОВИ ЧЕЛОВЕКА.**Т.В.Тишко, В.П.Титарь, Т.М.Бархоткина*, А.М.Набока, В.И.Некрасов, А.А.Кудь*****Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина
Украина, 63077, Харьков, пл. Свободы, 4***Харьковский государственный медицинский университет
Украина, Харьков, пр. Ленина, 4**** Харьковская областная клиническая больница
Украина, Харьков, пр. Правды, 13*

Статья поступила в редакцию 29 сентября 2000 г.

Исследовано влияние озонотерапии на изменение формы эритроцитов крови у здорового человека и больных с нейросенсорной тугоухостью. Обнаружено, что внутривенное вливание озонированного физиологического раствора больным приводит к качественному изменению формы эритроцитов крови в направлении ее нормализации. Изменение формы плоского диска на явно выраженную двояковогнутую форму эритроцитов приводит к увеличению отношения поверхность/объем у эритроцитов, к повышению их функциональных возможностей, что проявляется в достигнутом клиническом эффекте. Показана целесообразность применения метода голографической интерференционной микроскопии для оперативной медицинской диагностики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: озонотерапия, голография, интерферометрия, микроскопия, эритроцит, нейросенсорная тугоухость.

В последние десятилетия в Украине, России и других странах (Германия, Куба, Италия, Австрия, США) для нормализации кислородного обеспечения тканей при различных патологических состояниях используется озонотерапия. Парентерально вводимый озон способствует повышению эластичности эритроцитов, увеличению парциального давления кислорода в артериальной крови, облегчению отдачи кислорода оксигемоглобином, особенно в очаге ишемии [1-6]. Вышесказанное побудило нас апробировать применение системной озонотерапии у пациентов с нейросенсорной тугоухостью. Актуальность проблемы нейросенсорной тугоухости определяется ее социальной значимостью, отсутствием достаточных данных о патогенезе заболевания, малой эффективностью существующих в настоящее время методов лечения.

Нейросенсорная тугоухость (НСТ) наряду с ишемической болезнью сердца и гипертонией относится к заболеваниям, возникновение которых обусловлено отрицательными последствиями цивилизации. По данным Всемирной организации здравоохранения в настоящее время более 450 млн. человек, то есть более 7% населения земного шара страдают нарушением слуха и эти показатели неуклонно увеличиваются.

Согласно современным представлениям, в основе развития НСТ вне зависимости от ее этиологического фактора, лежит нарушение микроциркуляции, которая приводит к дефициту кислорода, питательных веществ ионного и кислотного-основного дисбаланса на том либо ином уровне слухового анализатора с последующим отрицательным влиянием на функцию звуковоспринимающего аппарата. Поражению последнего приводят также изменения реологических свойств крови, в формировании которых большое значение придают эритроцитам и их способности к агрегации. Очевидно, в этих условиях эритроциты теряют свою нормальную эластичность и форму, увеличивая вязкость крови и агрегирование, сокращение притока кислорода к эритроцитам.

Известно, что основной мишенью биологического действия озона на клетку выступают плазматические мембраны. Благодаря тому, что озон изменяет структуру липидов мембран, увеличивается деформабельность эритроцитов, что может являться одним из саногенетических факторов озонотерапии. В литературе последних лет встречаются данные об исследованиях деформабельности эритроцитов. Так для измерения вязкости липидного слоя мембран исследовали спектр флуоресценции теней эритроцитов [6], изучали физические параметры деформабельности методом микроскопической аспирации мембран эритроцитов, позволяющей анализировать характер распределения по параметрам для клеток одной пробы [7].

Однако, данные об изменении формы эритроцитов под воздействием медицинского озона в организме человека отсутствуют.

В данной работе методом голографической интерференционной микроскопии исследовалось изменение формы эритроцитов *in vivo* под воздействием медицинского озона при обследовании пациентов с НСТ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проводились на базе лаборатории радио- и оптической голографии ХНУ и кафедры оториноларингологии Харьковского государственного медицинского университета и ЛОР-отделения Харьковской областной клинической больницы.

Для изучения формы эритроцитов использовался голографический интерференционный микроскоп. Методы голографической интерференционной микроскопии являются наиболее оптимальными для оп-

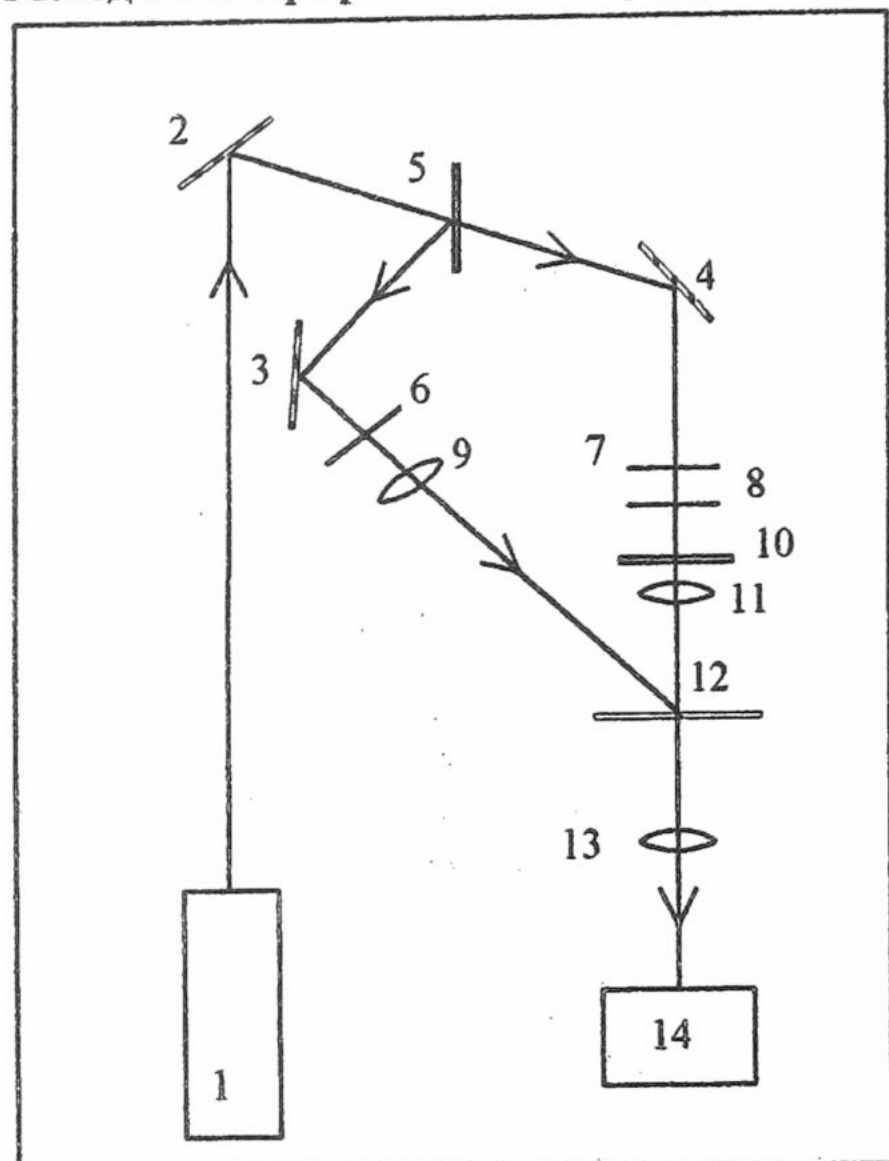


Рис.1 Оптическая схема голографического интерференционного микроскопа

1-лазер; 2,3,4 -зеркала; 5-полупрозрачное зеркало; 6,7,8-поляризаторы; 9-колиматор; 10-препарат; 11-микрообъектив; 12-голограмма; 13-окуляр; 14-блок регистрации изображения.

Москва). Для измерения концентрации озона использовалась йодометрическая методика, разработанная институтом электрохимии АН РФ совместно с фирмой "Медозон". Курс лечения включал 5 внутривенных капельных инфузий по 200,0 мл озонированного физиологического раствора. Концентрация озона 0,48 мг/мл.

Всем больным проводилось аудиологическое обследование. Улучшение слуховой функции в результате лечения получено у всех пациентов. В группу контроля вошло 18 здоровых доноров из числа студентов ХНУ, ХГМУ, а также ординаторов ЛОР-отделения ХОКБ.

Мазки крови брали до начала лечения, сразу же после первого внутривенного вливания ОФР (забор крови производился из кубитальной вены), а также по окончании курса лечения (забор крови произвольный).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

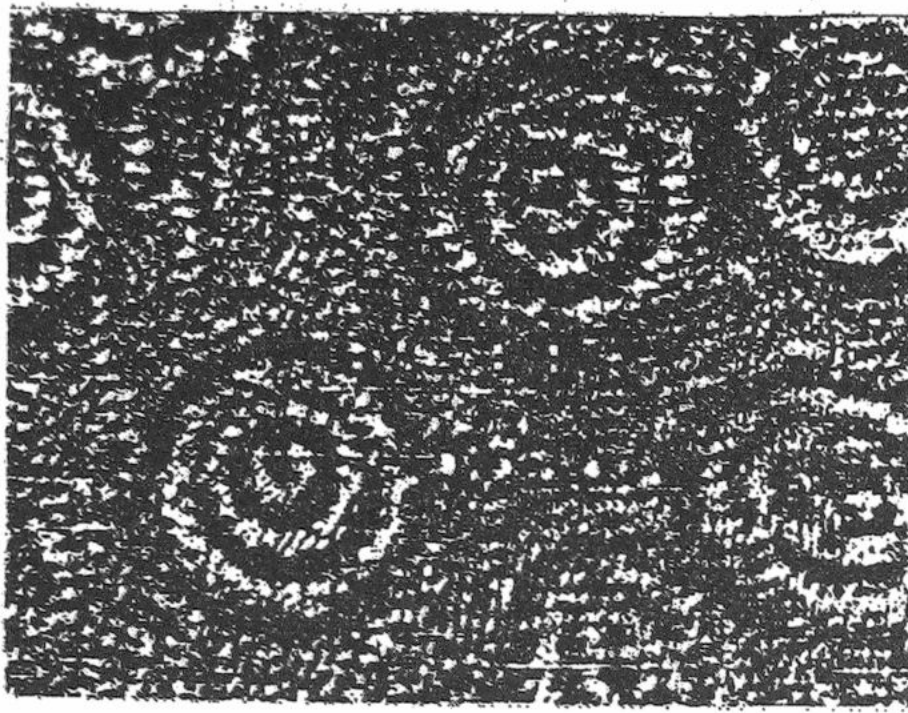
В результате исследования выявлено, что у всех пациентов, вне зависимости от генеза заболевания определялись сладжированные эритроциты, встречались микротромбы. Эритроциты имеют плоскую форму, что несомненно снижает их функциональные возможности. После введения озонированного физиологического раствора уменьшается число патологически измененных деструктивных форм, агрегирующих клеток, эритроциты приобретают выраженную двояковогнутую форму, причем терапевтический эффект более выражен при максимальных первоначальных патологических отклонениях в форме эритроцитов. У здоровых доноров с выраженной двояковогнутой формой эритроцитов введение ОФР не влияет на форму последних. В качестве примера мы приводим несколько клинических наблюдений.

На рис.2 представлены результаты восстановления формы эритроцитов крови здорового человека (пациентка М., 18 лет) до и сразу после введения (ОФР). На рис.2 (а, б) - микрофотографии эритроцитов, на рис.2 (в, г) - их интерферограммы, а на рис.2 (д, е) - восстановленные с помощью компьютера по

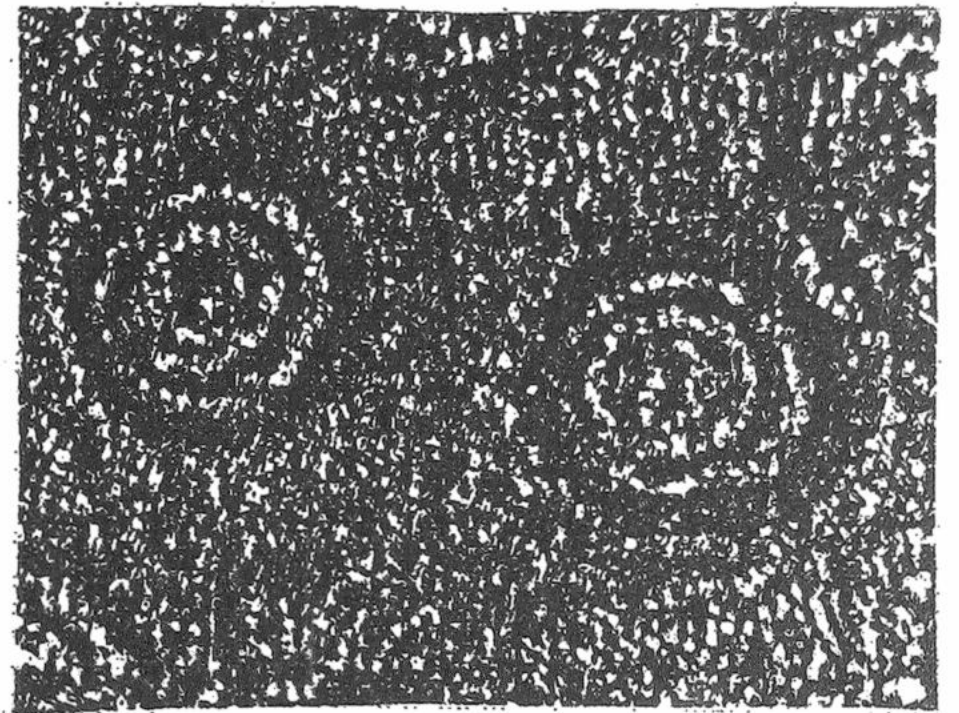
определения формы фазовых биологических микрообъектов. Их эффективность для изучения формы эритроцитов крови человека показана в [9 - 13]. Оптическая схема голографического интерференционного микроскопа представлена на рис.1. В голографическом интерференционном микроскопе формировались интерферограммы исследуемых микрообъектов за счет интерференции невозмущенной микрообъектами волны (эта волна с помощью опорной волны регистрируется и восстанавливается по голограмме) и волны, прошедшей через исследуемые микрообъекты. В качестве источника излучения использовался He - Ne лазер с длиной волны излучения 0,63мкм. Интерферограммы получали в реальном масштабе времени. В эксперименте использовались нативные мазки крови. Изображения эритроцитов и их интерферограммы фотографировали на пленку при использовании микрообъектива 40^x и окуляра 7^x. По интерферограммам с помощью компьютера строились трехмерные изображения эритроцитов.

Было обследовано 60 пациентов с нейросенсорной тугоухостью различного генеза (вирусная этиология, сосудистая, токсическая, посттравматическая и неясного генеза). Из них 33 мужчин и 27 женщин. Возраст пациентов от 18 до 67 лет. В 23 случаях процесс был острый, а в 37 - хронический.

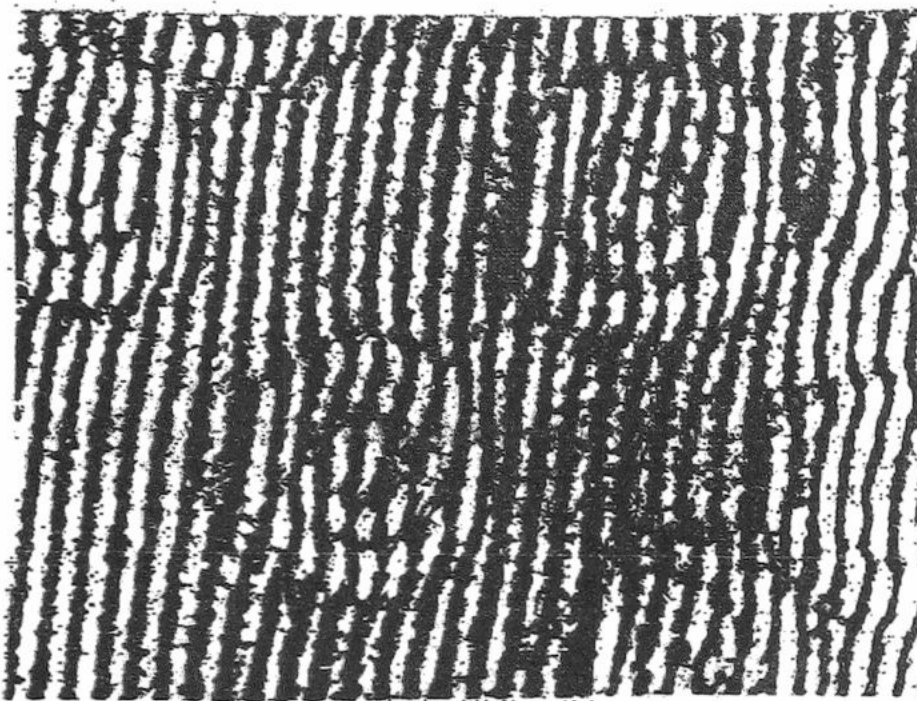
Всем пациентам проводилась монотерапия озоном. Озонирование физиологического раствора (ОФР) осуществлялось на озонаторной установке фирмы "Медозон" (г.



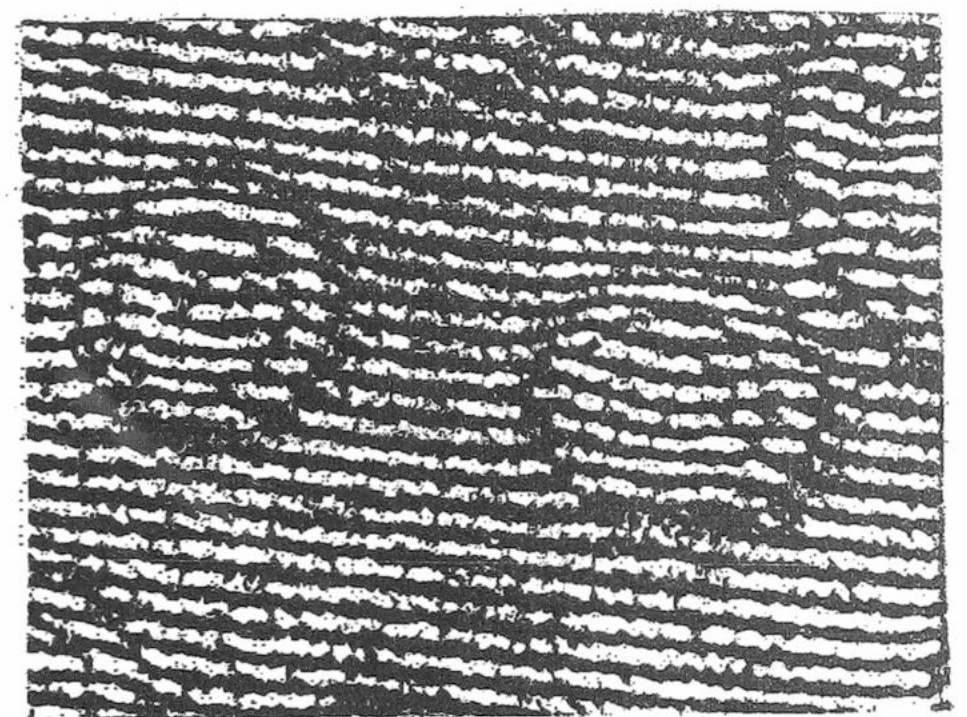
а



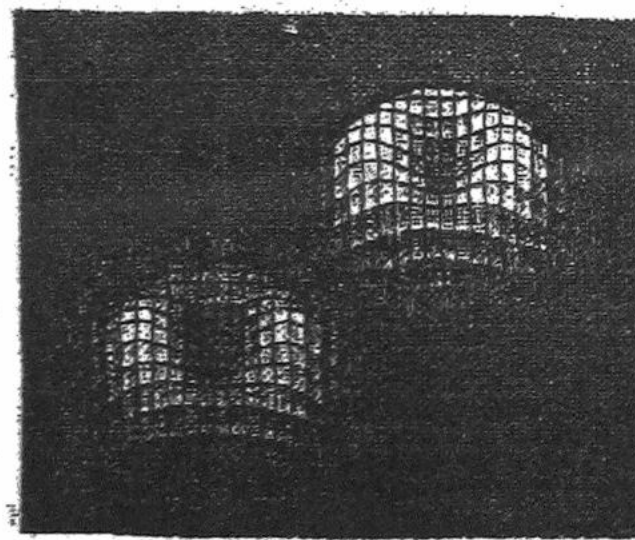
б



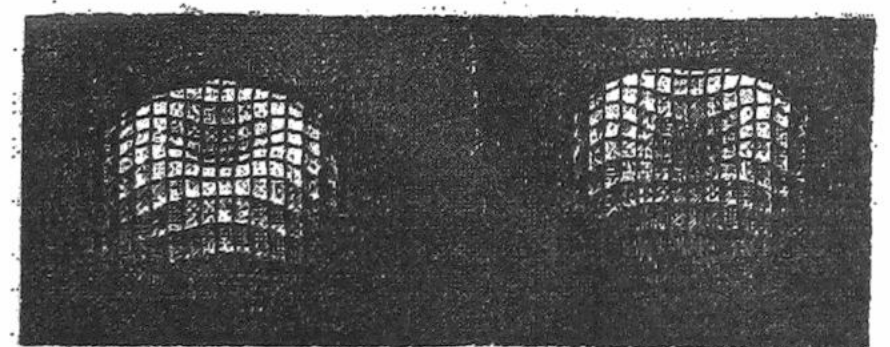
в



г



д

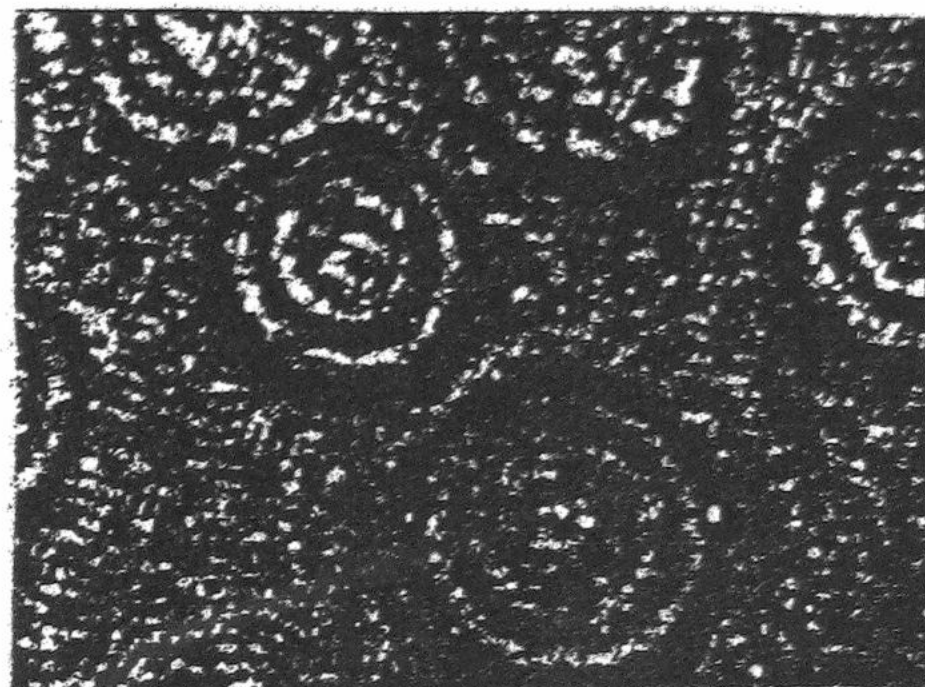


е

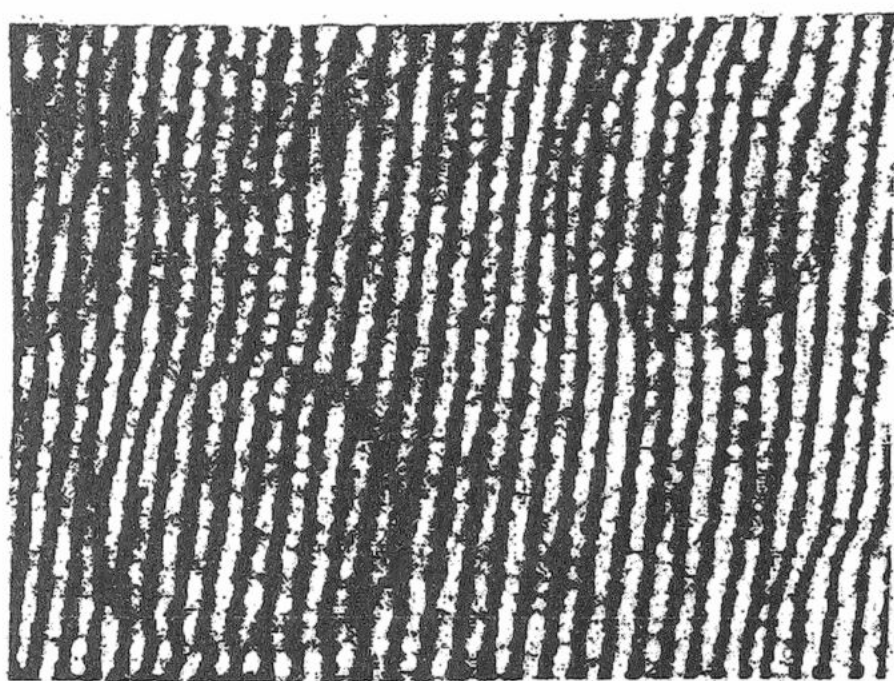
Рис.2. Микрофотографии, интерферограммы и реконструированные по ним изображения эритроцитов крови здоровой пациентки М., 18 лет, до введения озонированного физиологического раствора (а, б, д) и сразу после введения (б, г, е). Увеличение 2500 $\times$.



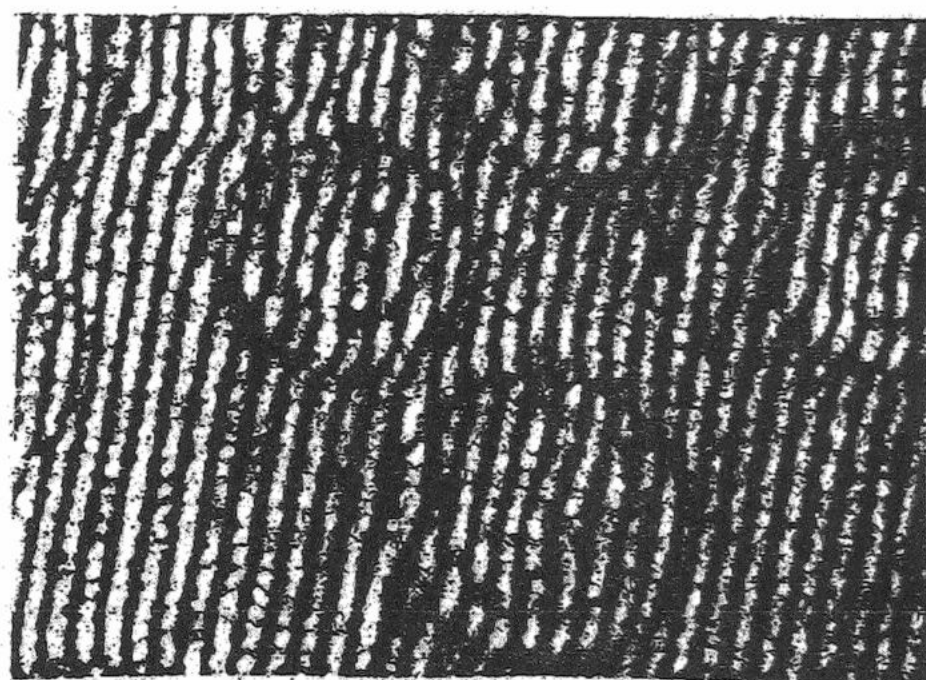
а



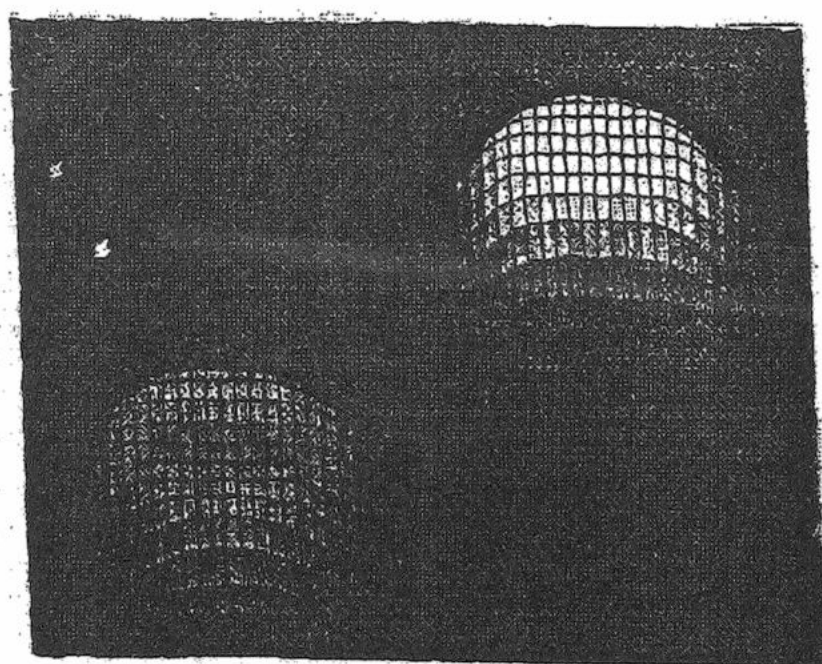
б



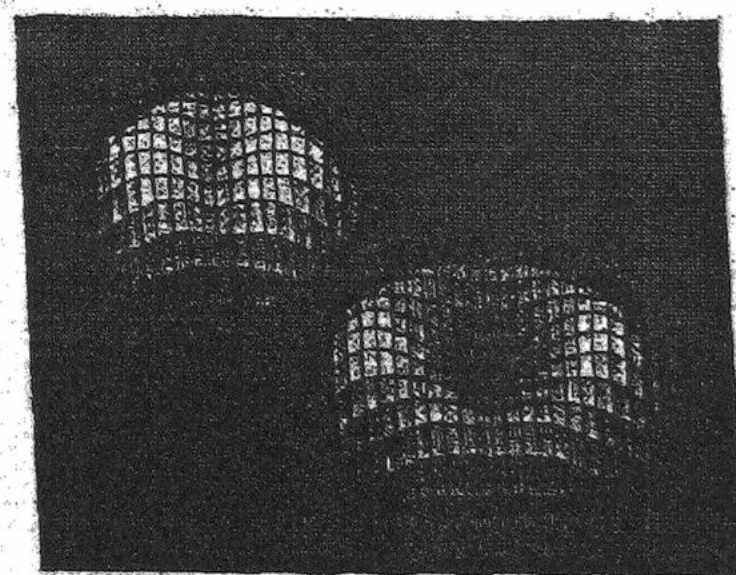
в



г

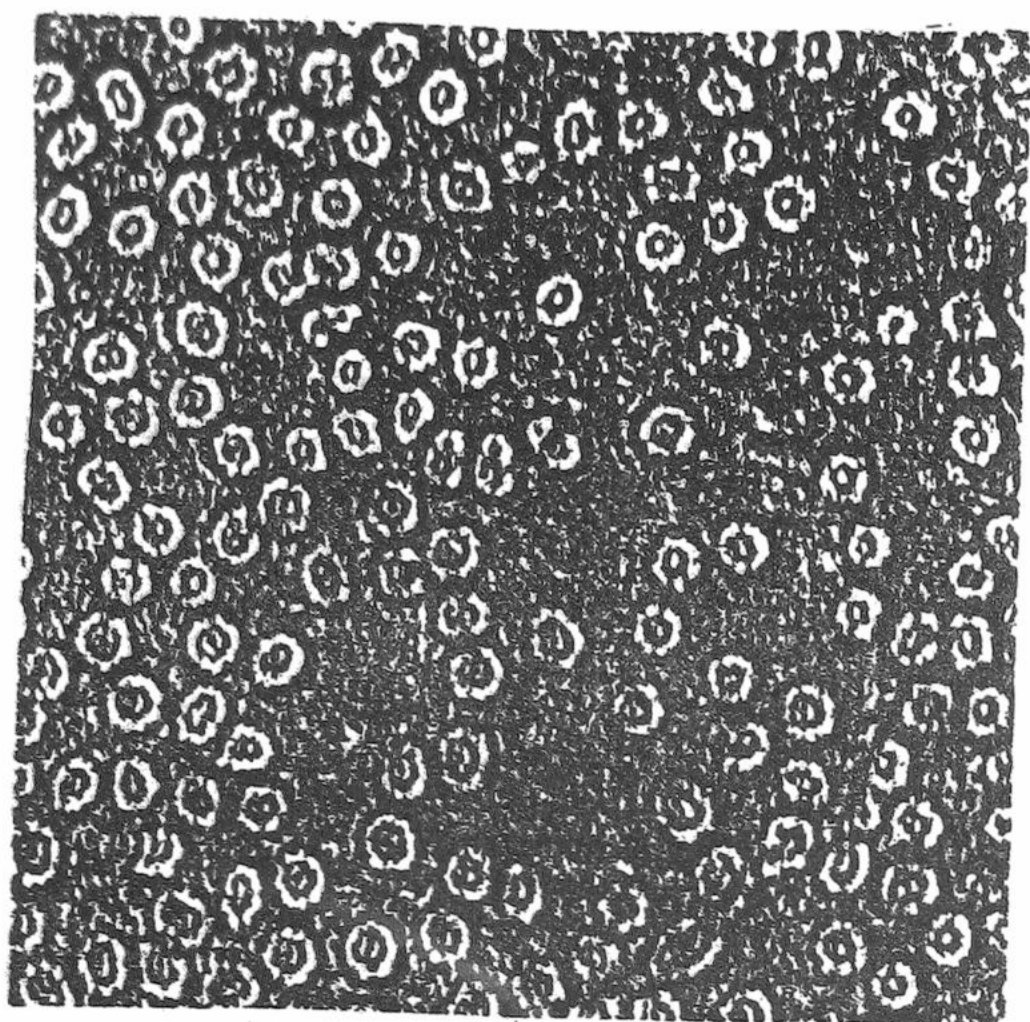


д

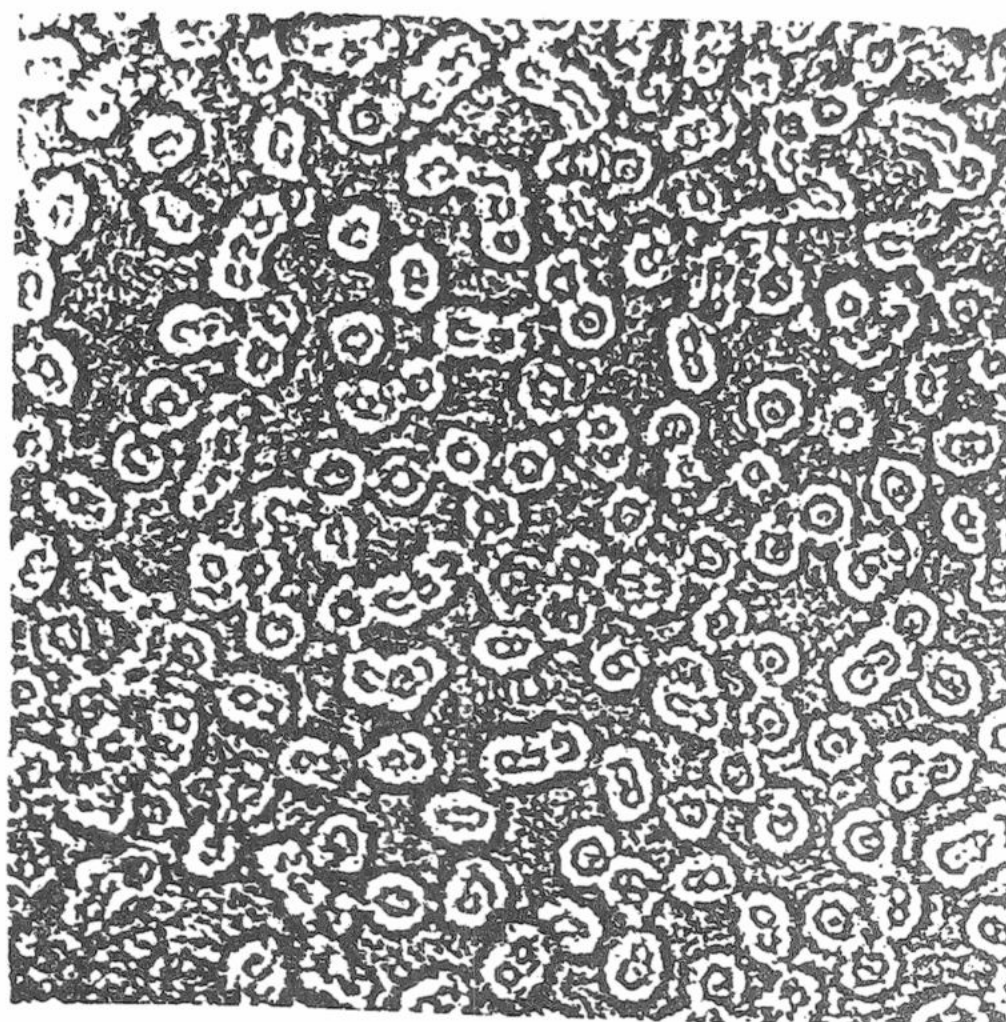


е

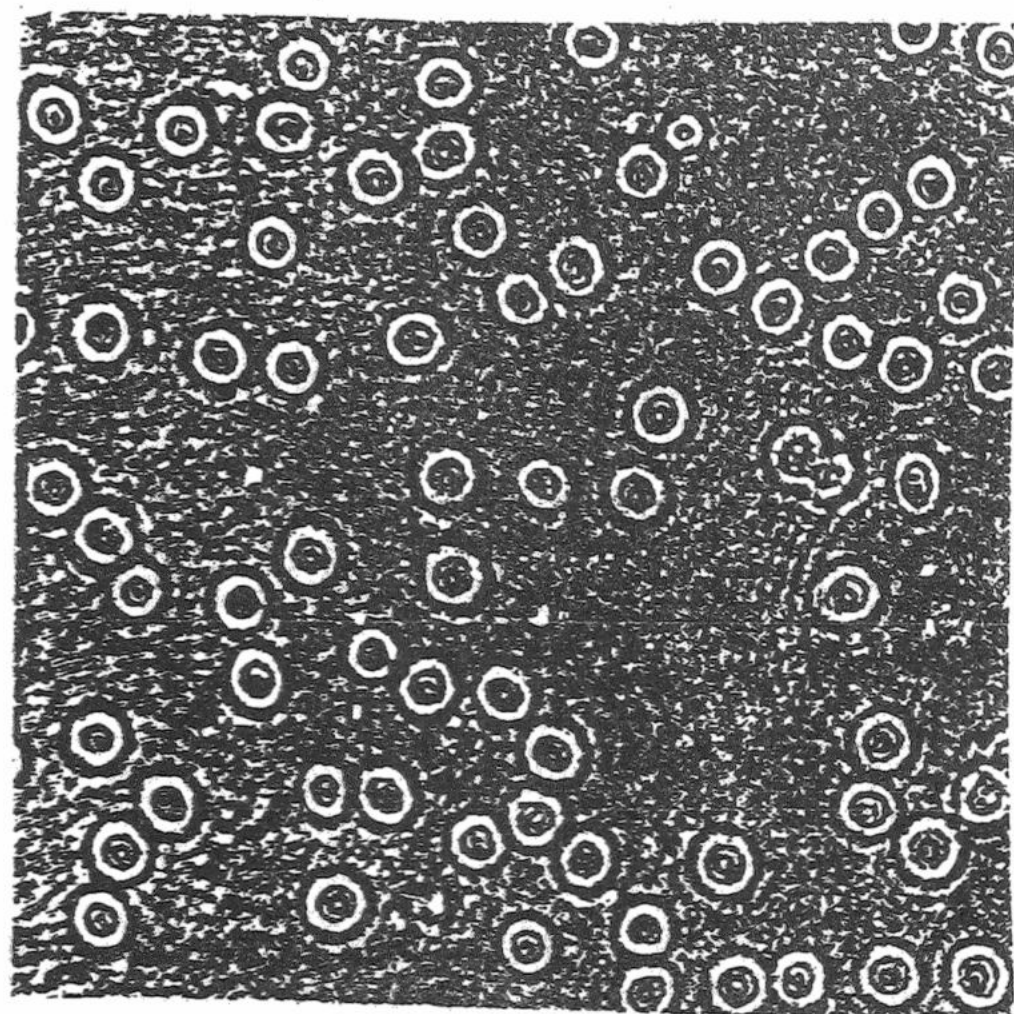
Рис.3. Фотографии, интерферограммы и реконструированные по ним изображения эритроцитов крови больного Ю., 27 лет, до начала лечения (а, в, д) и сразу после введения ОПР (б, г, е). Увеличение 3000 $\times$



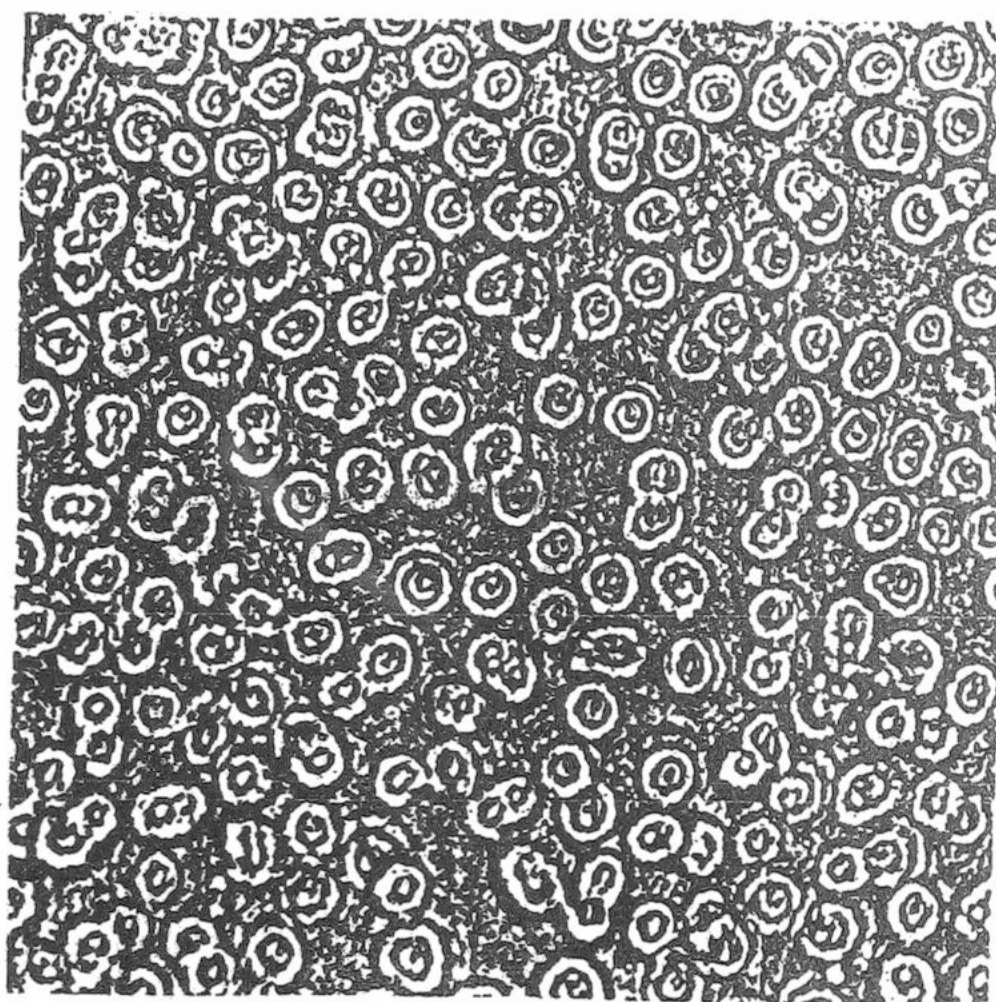
а



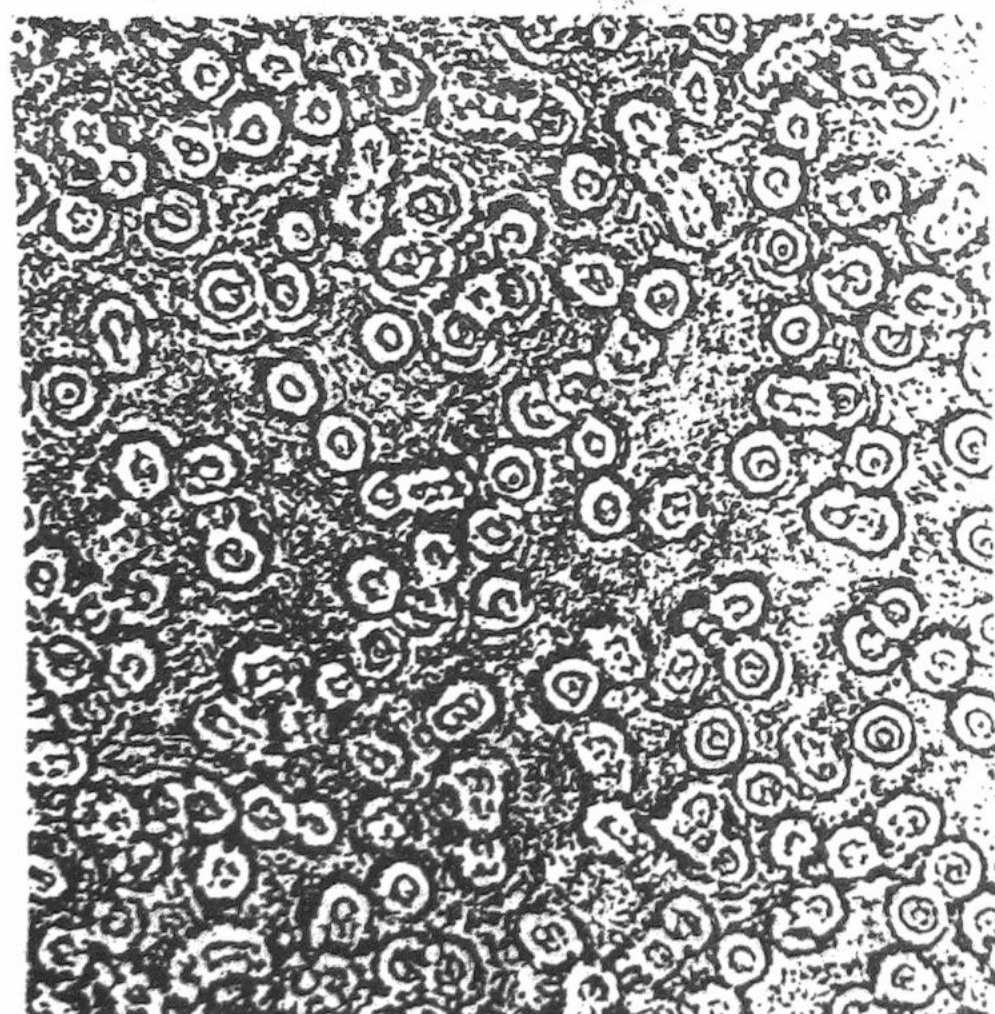
б



в

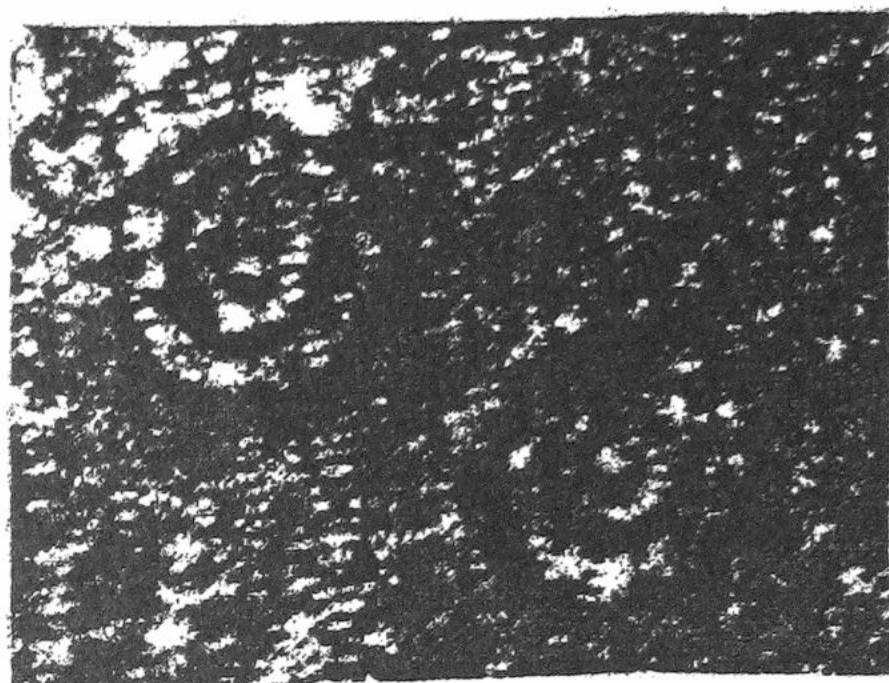


г

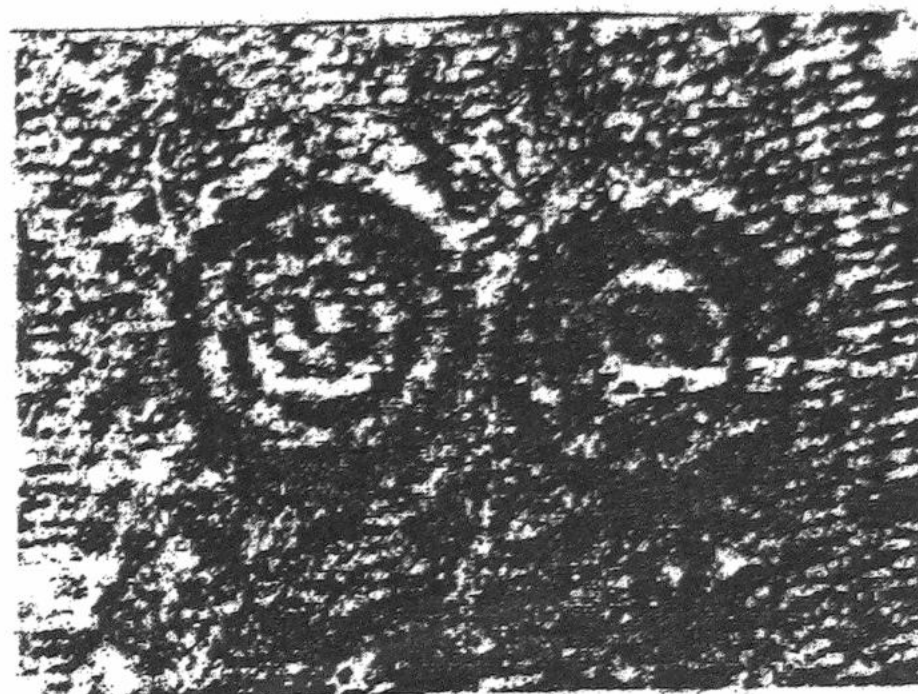


д

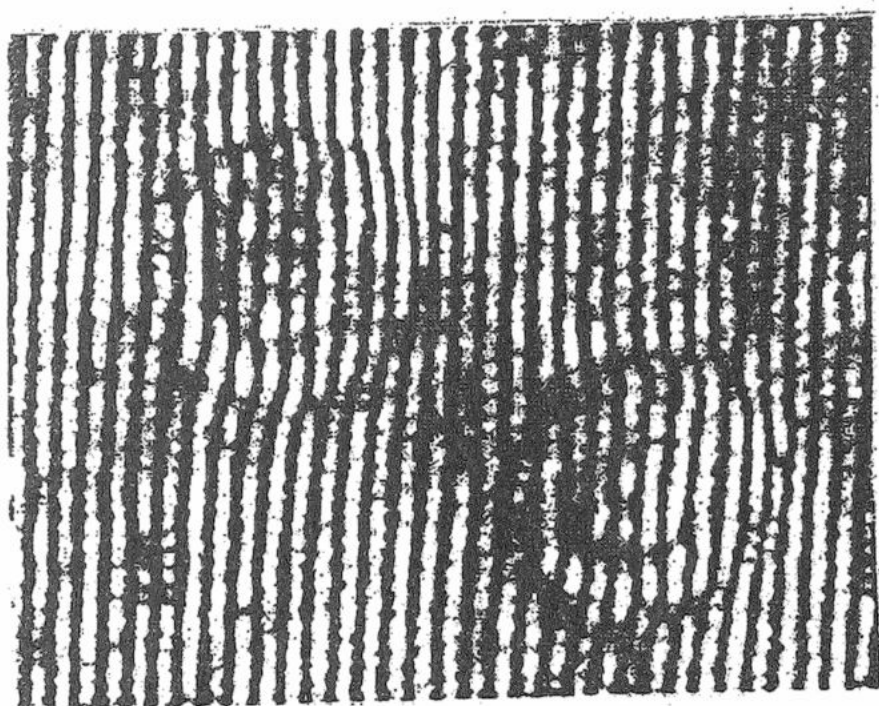
Рис.4. Фотографии мазков крови больной Л., 67 лет, до начала лечения (а) и сразу после введения ОФР (б). Фотографии мазков крови больного К., 46 лет, до начала лечения (в), сразу после введения ОФР (г) и после курса лечения (д). Увеличение $500\times$



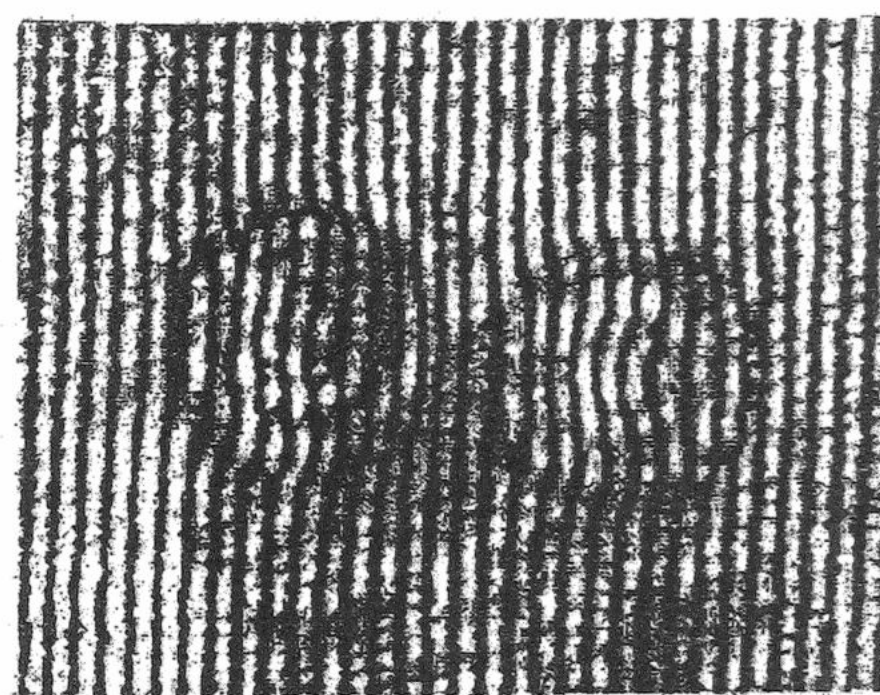
а



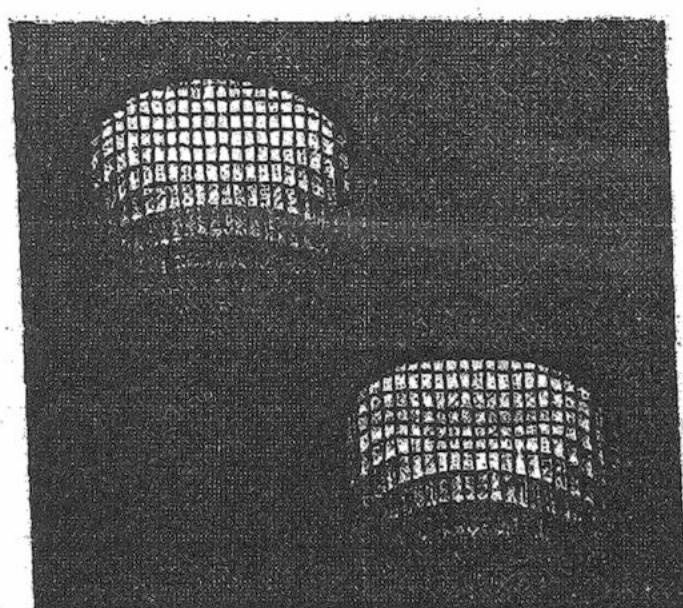
б



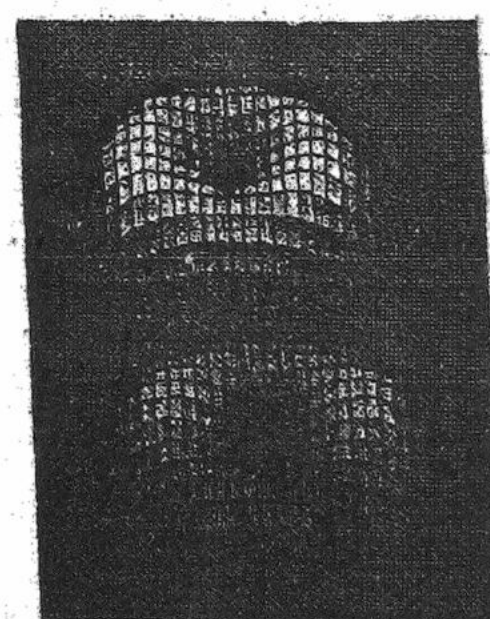
в



г

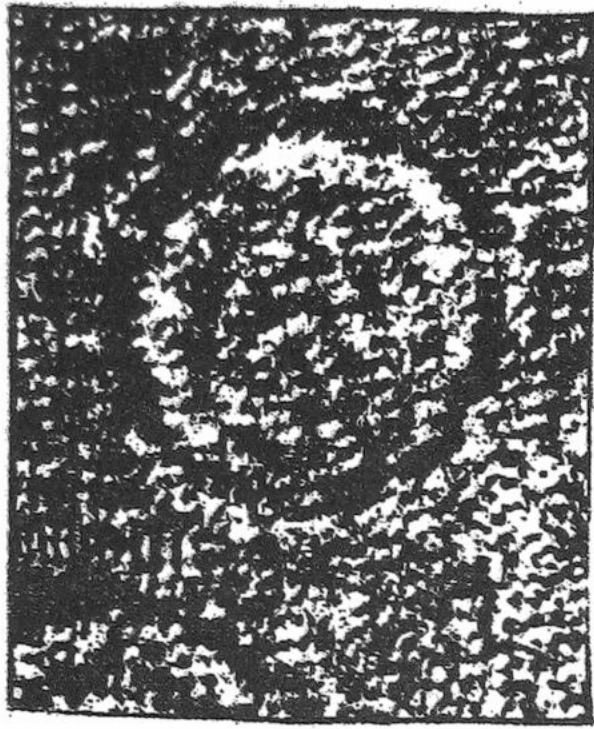


д

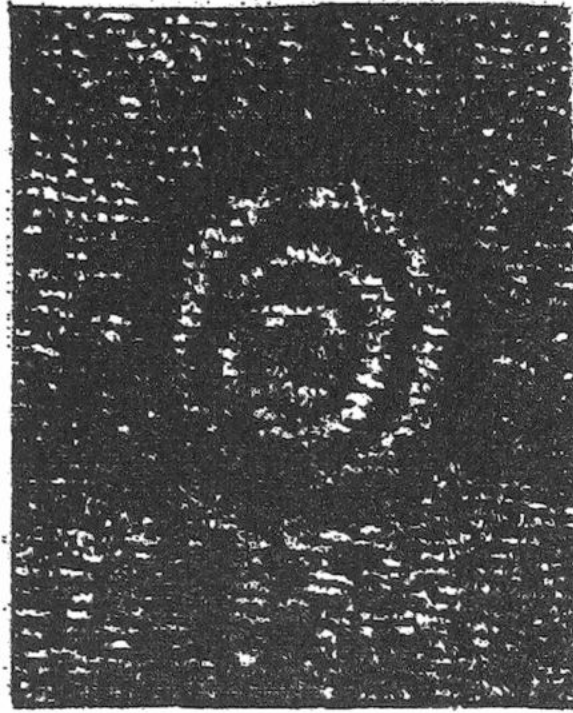


е

Рис.5. Фотографии, интерферограммы и реконструированные по ним изображения эритроцитов крови больной Л., 67 лет, до начала лечения (а, в, д) и сразу после введения ОФР (б, г, е). Увеличение $2500\times$



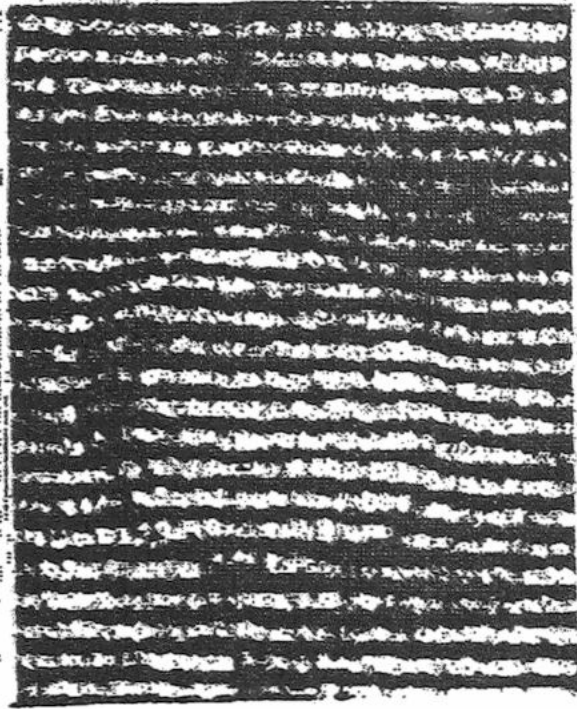
а



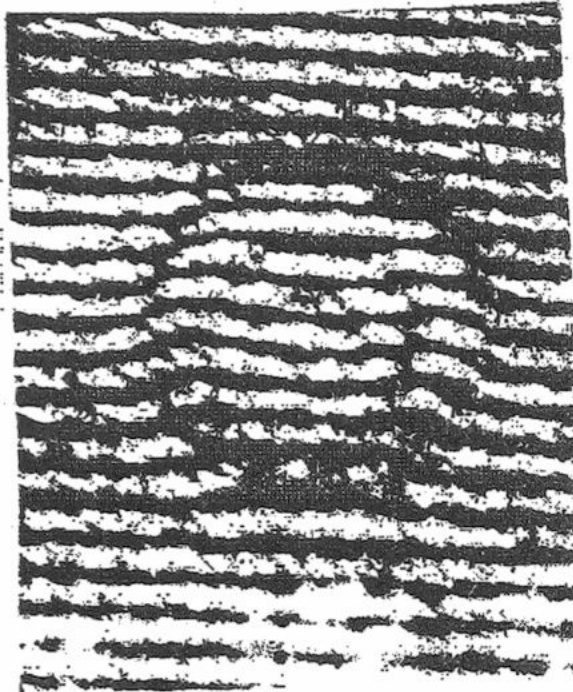
б



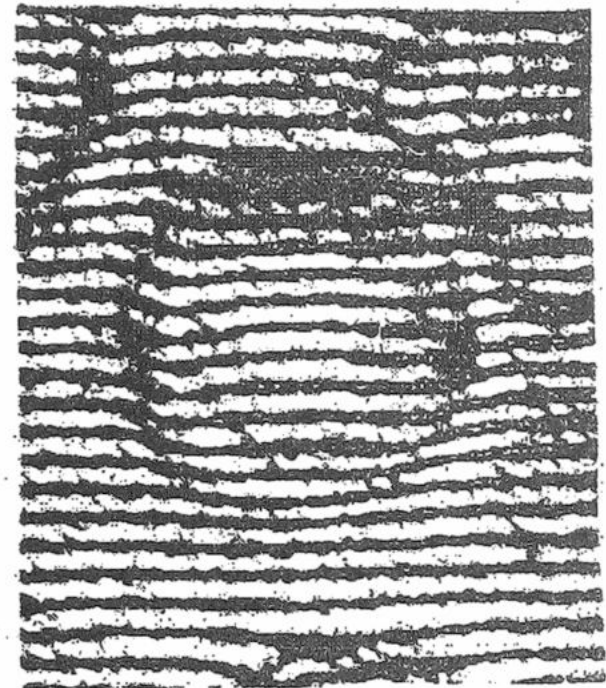
в



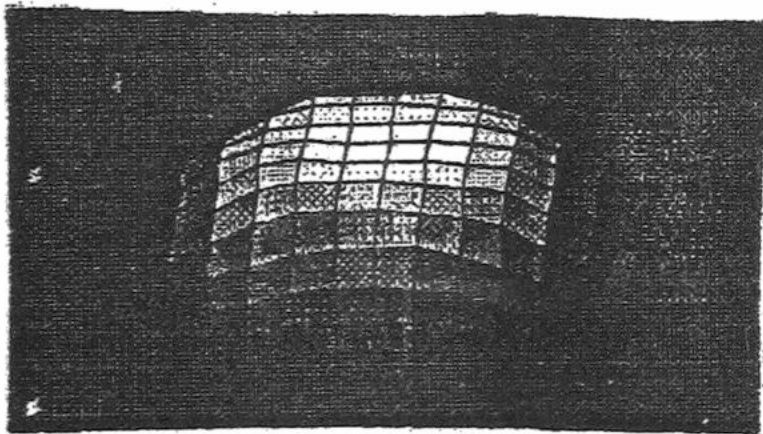
г



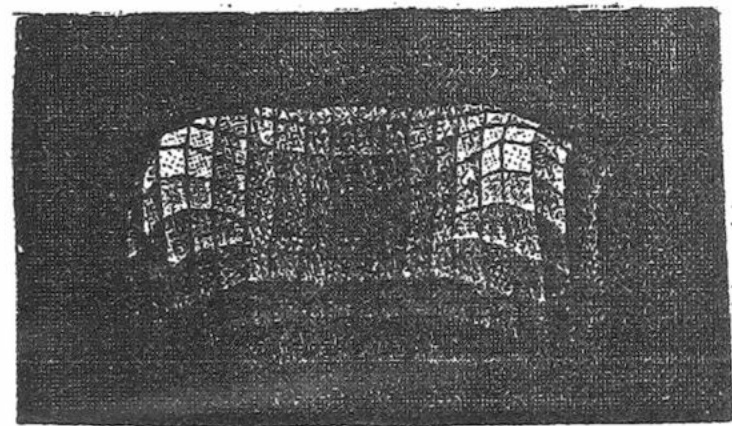
д



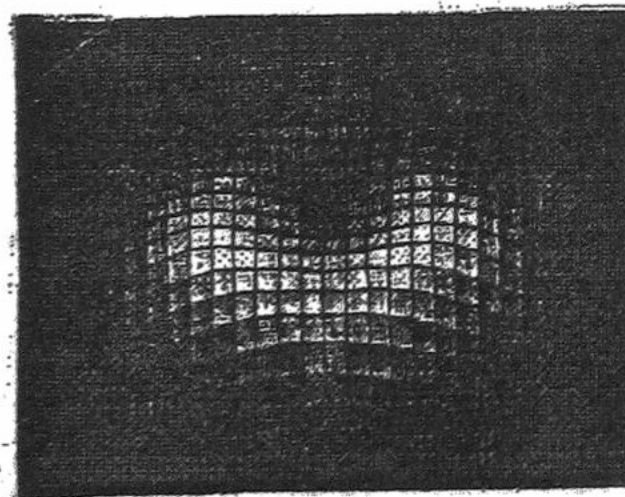
е



ж



з



и

Рис.6. Фотографии, интерферограммы и реконструированные по ним изображения эритроцитов крови больного К., 46 лет, до начала лечения (а, г, ж), сразу после введения ОФР (б, д, з) и после курса лечения (в, е, и). Увеличение 3500 $\times$

оцифрованным интерферограммам трехмерные изображения эритроцитов. Из сравнения приведенных фотографий видно, что у здоровой пациентки качественных изменений формы эритроцитов после введения ОФР не произошло. Как до, так и после введения ОФР эритроциты имеют четко выраженную двояковогнутую форму, что соответствует физиологической норме.

На рис.3 представлены результаты исследования крови больного Ю., 27 лет. Диагноз: острая НСТ вирусного генеза. Из сравнения приведенных фотографий видно, что до начала лечения эритроциты пациента имели форму плоского диска, а сразу после введения ОФР эритроциты приобретают двояковогнутую форму, соответствующую норме.

На рис.4 представлены микрофотографии мазков крови больной Л., 67 лет, страдающей хронической НСТ сосудистого генеза (давность заболевания более 10 лет). На рис.4 (а) изображен мазок крови до начала лечения, а на рис.4(б) - сразу после введения ОФР. Уже на фотографиях видно, что после введения ОФР с эритроцитами произошли существенные изменения, однако, сделать заключение о характере этих изменений не представляется возможным.

На рис.5 представлены результаты, полученные по интерферограммам этой пациентки. Они ясно показывают, что с формой эритроцитов после введения ОФР произошли качественные изменения. Если до начала лечения эритроциты имели форму плоского диска, то после введения ОФР они приобретают двояковогнутую форму.

На рис.4 представлены микрофотографии мазков крови больного К., 46 лет, страдающего НСТ посттравматического генеза (давность заболевания 3 года), до начала лечения (в), сразу после введения ОФР (г) и после курса лечения (д). На микрофотографиях мазка крови до лечения определяются сладжированные эритроциты, встречаются микротромбы. После введения ОФР уменьшается число патологических изменений деструктивных форм, агрегирующих клеток.

На рис.6 представлены результаты для этого пациента, полученные по интерферограммам. Фотографии(а, г, ж) соответствуют результатам до начала лечения, (б, д, з) - сразу после введения ОФР, (в, е, и) - после курса лечения. Как и в случае предыдущих пациентов, эритроциты этого больного до начала лечения имеют форму плоского диска, после введения ОФР - двояковогнутую форму.

На рис.3 -6 представлены результаты для больных, представляющих различные возрастные группы. Такие же результаты наблюдались у всех обследованных пациентов. Проведенные исследования позволяют сделать два основных заключения: у всех больных до начала лечения эритроциты имеют форму плоского диска, у всех больных после введения ОФР наблюдается однотипное качественное изменение формы эритроцитов, последние приобретают двояковогнутую форму, соответствующую норме что, очевидно, приводит к увеличению их поверхности при данном объеме и повышению их функциональных возможностей.

Полученные результаты по изменению формы эритроцитов у больных после однократного введения ОФР поставили вопрос о длительности сохранения эритроцитами двояковогнутой формы. Для выяснения динамики этого процесса у 17 больных проводился забор крови из кубитальной вены сразу после введения ОФР, через 1, 2, 12, 24 часов. Исследования показали, что уже через два часа после первого введения ОФР в мазке крови присутствуют только плоские эритроциты. Однако, при произвольном заборе крови у пациентов после курса лечения (5 внутривенных инфузий ОФР) эритроциты имеют двояковогнутую форму (рис.6 (в, е, и)). Очевидно, что при однократном введении ОФР действию озона подвергается лишь часть эритроцитов, а полный курс лечения позволяет качественно изменить весь объем циркулирующей крови. Однако, динамика этого процесса требует специального исследования.

В нашем случае озонирование применялась для лечения больных с НСТ. Исследования показали, что системная озонотерапия приводит к изменению формы эритроцитов у больных в сторону ее нормализации, что благотворно сказывается на состоянии всего организма. Поэтому эффективность применения озонотерапии выходит за рамки лечения только НСТ.

ВЫВОДЫ

Таким образом, применение метода голографической интерференционной микроскопии для изучения влияния парентеральных методов озонотерапии на форму эритроцитов больных НСТ позволило установить, что после введения озонированного физиологического раствора эритроциты у всех пациентов претерпевают однотипные качественные изменения, приобретая четко выраженную двояковогнутую форму, которая соответствует норме. Это приводит к повышению функциональных возможностей эритроцитов, что проявляется в достигнутом лечебном эффекте. У здорового человека качественных изменений формы эритроцитов после проведения озонотерапии не выявлено.

Проведенные исследования подтвердили, что эритроциты крови являются клетками организма, не только биохимические характеристики которых, но и форма определяет и отражает физиологическое состояние всего организма. Определение формы клеток крови и их изменений при различных заболеваниях представляет не только научный интерес, но и может явиться методом оперативной диагностики, дополняющим уже известные методы клинических исследований. Голографический интерференционный

микроскоп, позволяющий исследовать нативные препараты в реальном масштабе времени, возможность проведения количественных измерений параметров микрообъектов может и должен стать оперативным прибором в различных медицинских исследованиях.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Конев С.В., Матус В.К. // Материалы I Всероссийской научно-практической конференции "Озон в биологии и медицине", Нижний Новгород, 1992, С.3-7
2. Конторщикова К.Н. //Материалы II Всероссийской научно-практической конференции "Озон в биологии и медицине", 1995, С.8
3. Перетягин С.П. Дисс...Докт.Мед.наук,Нижний Новгород,1991,С.12 -14.
4. Филатов В.Ф., Калашник М.В., Бархоткина Т.М. //Фотобіологія та фотомедицина.,1999, №1,С.32-35.
5. Гомес М., Еспиноза Е., Каплан И.А. //Материалы II Всероссийской научно-практической конференции "Озон в биологии и медицине", Нижний Новгород,1995, С.69-70.
6. Козлов Д.В., Конторщикова К.Н. //Материалы III Всероссийской научно-практической конференции "Озон и методы эфферентной терапии в медицине", Нижний Новгород,1998, С.14.
7. Кокшаров И.А., Перетягин С.П., Яхно В.Г. //Материалы I Всероссийской научно-практической конференции "Озон в биологии и медицине", Нижний Новгород,1992, С.3-7.
8. Сафронов Г.С., Тишко Т.В. // Украинский физический журнал, 1985, т.30, №7, С.994-997.
9. Tishko T. V., Titag V. P. //Тезисы докладов X Международной научно-практической конференции "Применение лазеров в медицине и биологии", Харьков, 1998, С.148.
10. Тишко Т.В., Титарь В.П., Панфилов Д.А., Тишко Д.Н. //Биологический вестник,1998, т.2, №1, С.107-110.
11. Тишко Т.В., Титарь В.П., Некрасов В.П., Шпаченко О.Н. // Тезисы докладов XIV Международной научно-практической конференции "Применение лазеров в медицине и биологии", Харьков, 2000, С.16.
12. Божков А.И., Титарь В.П., Тишко Т.В. Свідомство про державну реєстрація прав автора на твір. ПА № 2071, 1999.

*К 70-летию со дня рождения***Владимира Яковлевича Малеева***Фото: Мюнхен 2000 г.*

*Ни один благородный ум
не остановится по своей
воле на уже достигнутом:
он всегда станет притязать
на большее
и выбиваться из сил,
и рваться к непостижимому.*

Монтень

На рубеже тысячелетий, в конце XX столетия, качественно изменившего приоритеты научного поиска человечества, исполнилось семьдесят лет Владимиру Яковлевичу Малееву, ученому, с именем которого связано становление и развитие в бывшем СССР и особенно на Украине новой науки - биофизики.

Он родился 30 марта 1930 года в Ростове-на-Дону. Вскоре семья переехала в Харьков, где с 1932 года его отец, известный инженер-строитель, руководил созданием таких грандиозных сооружений как ХТЗ, новые корпуса завода им. Малышева, здание ЦК КПУ. Свое образование Володя Малеев начал в 1937 году в нынешней 5-й харьковской школе. После эвакуации он продолжил учебу в 36-й средней школе г. Харькова, которую окончил в 1948 году с медалью и поступил на физико-математический факультет Харьковского государственного университета. Осваивая специальность на кафедре технической физики, он параллельно посещал лекции по курсам теоретической физики и к окончанию университета уже сформировался как физик-теоретик.

С 1953 года В.Я. Малеев по направлению начал работать в ХВАИВУ, где преподавал курс теоретической механики. В это же время он начал посещать научные семинары в университете. Тогда впервые у него появилось желание объяснить некоторые особенности живых систем физическими закономерностями.

В 1956 году Владимир Яковлевич переходит на работу в Институт радиофизики и электроники АН Украины. Под руководством заведующего теоретическим отделом института профессора Германа В.Л. он занимается теоретическим изучением режимов работы магнетронных генераторов. Эти исследования завершились в 1961 году успешной защитой кандидатской диссертации в специализированном совете по физико-математическим наукам УФТИ, которым руководили такие выдающиеся ученые как Синельников К.Д. и Вальтер А.К.

Но мысли о раскрытии физических тайн жизни не давали покоя. Малеев с группой сотрудников начинает исследование влияния постоянных магнитных полей на одноклеточные организмы в отделе поглощения радиоволн, руководителем которого

был директор института А.Я. Усиков. Эти работы, показавшие исключительную сложность живых организмов, подтолкнули молодого ученого перейти к рассмотрению процессов на молекулярном уровне. Как раз в это время стали широко известны работы Уотсона и Крика, и В.Я. Малеева захватывает фантастическая проблема расшифровки генетического кода.

Вот здесь и нашли свое приложение его знания и характер мышления физика-теоретика. Используя обратную задачу Штурма - Лиувилля, он впервые разработал теоретическую механическую модель, описывающую связи между нуклеотидами в одномерной цепочке ДНК. Нетривиальный подход к решению биологической задачи вызвал интерес у посетившего институт президента АН СССР М.В. Келдыша. Незадолго до этого Владимир Яковлевич по приглашению президента АН Украины Б.Е. Патона впервые сделал доклад о своих работах на секции бионики Научного совета Академии наук по проблемам электроники. В 1964 году по решению президиума АН УССР и при активной поддержке Б.Е. Патона в Институте радиофизики и электроники был создан отдел биофизики, который возглавил В.Я. Малеев.

С этих пор вся научная жизнь Владимира Яковлевича была подчинена развитию биофизики. Предложенная Малеевым гипотеза определения последовательности нуклеотидов в молекуле ДНК на основании анализа низкочастотных колебаний в цепочке упруго связанных элементов потребовала экспериментального подтверждения. Разработанная для этого физическая модель связанных электрических контуров не смогла решить эту задачу. Поэтому совместно с Ленинградскими физиками было проведено экспериментальное изучение колебаний в кристаллах мономеров нуклеиновых кислот в дальней ИК-области. В процессе исследований было обнаружено сильное поглощение молекул воды в этом диапазоне. Тогда у В.Я. Малеева и появилось предположение о важной роли воды в стабилизации структуры биологических макромолекул.

Начиная с середины 60-х годов гидратация биополимеров становится одним из основных научных направлений Владимира Яковлевича и возглавляемого им коллектива. Стала расширяться экспериментальная база отдела, были освоены методы ИК-спектроскопии, калориметрии, СВЧ-диэлектрометрии. В конце 60-х и в 70-е годы основными научными направлениями отдела стали исследования структурных переходов в растворах биополимеров и гидратно-зависимых процессов изменения конформации нуклеиновых кислот. По результатам этих исследований в 1976 году В.Я. Малеев успешно защищает докторскую диссертацию "Структурные переходы нуклеиновых кислот в растворах" по специальности молекулярная физика. Его оппонентами были академик Лифшиц И.М. и доктора наук Лазуркин Ю.С. и Благой Ю.П., а отзыв ведущей организации был подписан известным биофизиком Л.А. Блюменфельдом.

С начала 80-х годов в отделе проводятся исследования взаимодействия нуклеиновых кислот с биологически активными веществами, а с конца 80-х и в 90-е годы, после Чернобыльской катастрофы, исследования влияния радиации на структуру, комплексообразование и гидратацию ДНК.

За годы научной деятельности у В.Я. Малеева появилось много учеников, 17 из которых защитили кандидатские диссертации и двое - докторские. Но кроме них десятки ученых в разных странах мира считают Владимира Яковлевича своим учителем.

С 1964 года в Харьковском государственном университете началась подготовка студентов по специальности биофизика, в становлении которой активное участие принимал и Владимир Яковлевич. В 1978 году в университете открывается кафедра молекулярной и прикладной биофизики под руководством академика Б.И. Веркина, который пригласил Малеева для чтения лекций по специальным дисциплинам. С этого времени начинается педагогическая деятельность Владимира Яковлевича в области биофизического образования. И вот уже 22 года большая часть его жизни связана с

кафедрой биофизики Харьковского университета. За это время им разработаны оригинальные курсы лекций: «Методы биофизических исследований», «Общая биофизика», «Физика биополимеров». Он является автором паспорта специальности «биофизика» и членом экспертного совета Министерства образования, автором ряда методических работ и докладов на научно-методических конференциях. Более полутысячи студентов из 25 стран были благодарными слушателями его лекций. С 1992 года В.Я. Малеев возглавляет кафедру молекулярной и прикладной биофизики, которая благодаря его энтузиазму и высокому научному профессионализму стала центром не только харьковской, но и украинской биофизики.

Организаторская деятельность Владимира Яковлевича не ограничивается отделом биофизики ИРЭ и кафедрой в университете. Еще в 1971 году он организовал в Харькове I-ю Всесоюзную конференцию по спектроскопии биополимеров, которая в течение 20 лет регулярно проводилась под его председательством и была школой всех молекулярных биофизиков СССР.

С середины 70-х годов В.Я. Малеев – член бюро Научных советов по проблемам биологической физики Академий наук СССР и УССР, где он активно отстаивает приоритет биофизических исследований в современном естествознании.

Владимир Яковлевич принимал участие в создании таких научных журналов как «Биополимеры и клетка», «Проблемы криобиологии», «Радиофизика и электроника» и является членом их редакционных коллегий. В 1998 году благодаря его инициативе и под его руководством стал издаваться первый на Украине биофизический журнал – «Біофізичний вісник».

В.Я. Малеев – председатель Харьковского отделения и вице-президент Украинского биофизического общества, в создании которого в 1993 году он принимал активное участие. С этого времени под его руководством при университете начинает работу Харьковский биофизический семинар, на котором можно услышать научные доклады биофизиков всех регионов Украины. В 1998 году впервые в Харькове прошел прекрасно организованный Съезд Украинского биофизического общества, научным координатором и председателем рабочего оргкомитета которого был В.Я. Малеев.

В течение многих лет Владимир Яковлевич был членом специализированных научных советов по специальностям "молекулярная физика" и "криобиология", а в 1995 году по его инициативе был создан единственный на Украине специализированный совет по защите докторских и кандидатских диссертаций по специальности "биофизика" физико-математических наук, председателем которого он является. За несколько лет работы совета 30 ученых из разных городов Украины стали обладателями дипломов доктора или кандидата наук по этой специальности.

Результаты исследований профессора В.Я. Малеева, его коллег и учеников широко известны и признаны во всем научном мире, а некоторые из 250 его научных трудов давно уже стали классическими. Но не столько цифры и перечисленные регалии, а глубокое уважение и искренняя благодарность, которые Владимир Яковлевич неизменно вызывает у большинства людей во многих странах мира, его огромный авторитет являются истинной оценкой его деятельности. Во многом это определяется характером личности В.Я. Малеева, сочетающей высокий интеллект и широкую эрудицию с исключительно теплым и внимательным отношением к окружающим.

Имя В.Я. Малеева давно уже неразрывно связано с эволюцией развития биофизики, но не только его научные, а и общечеловеческие интересы распространяются на многие области познания. Без преувеличения можно сказать, что Владимир Яковлевич – образец истинной интеллигентности, высокого эстетического вкуса, тонкого юмора и исключительного обаяния.

Друзья, коллеги, ученики и редколлегия "Біофізичного вісника" горячо поздравляют Владимира Яковлевича с Юбилеем и желают крепкого здоровья, долгих лет активной творческой деятельности, успеха и счастья во всех сферах жизни.

ABSTRACTS

MODELING LARGE-SCALE STRUCTURE DYNAMICS OF DNA MACROMOLECULES

S.N. Volkov

Bogolyubov Institute for Theoretical Physics, National Academy of Science of Ukraine, Metrologichna str 14-b, Kiev, 03143

Basing on the four-mass model approach developed earlier for the description of the low-frequency vibrations of the double helix and taking into account the peculiarities of the macromolecule structure. The possibility of the adequate model construction for large-scale dynamics of DNA structure transformations such as conformational transition and melting is shown. For the possible trajectories of the structure transformation the expressions for the conformation excitation energy are obtained in the two-component form. The kinetic energy parameters and the potential functions view are determined for the modeling of the DNA large-scale motions. It is shown that the kinetic energy of the conformational excitation of the heterogeneous macromolecule may be put in the homogeneous form. The conclusion is made about the existence of the two types of DNA conformational mobility sensitive and insensitive to macromolecule heterogeneity.

KEY WORDS: macromolecules, DNA, heterogeneity, conformational dynamics, modeling

**PHYSICAL MECHANISMS OF INTERACTION OF ACTINOCIN DERIVATIVES WITH DNA.
2. SPECTROSCOPIC STUDY OF INFLUENCE OF WATER ON INTERACTION OF
ACTINOCYL-BIS-(3-DIMETHYLAMINOPROPYL) AMINE WITH THYMUS DNA**

M.A. Semenov, N.N. Sagaidakova, T.V. Bolbukh, A.I. Gasan, E.B. Kruglova, E.G. Bereznyak, V.Ya. Maleev,
E.N. Glibin¹, D.V. Ovchinnikov¹, A.N. Veselkov²

*Institute for Radiophysics and Electronics Nat. Acad. Sci. of Ukraine, 12 Ak. Proskura st., Kharkov, 61085, Ukraine
e-mail: maleev@ire.kharkov.ua*

¹Sankt-Peterburg State Technical University, Russia

²Sevastopol State Technical University, Ukraine

The investigation of influence of water on interaction of actinocyl-bis-(3-dimethylaminopropyl) amine (ligand L1) with DNA in wet films and solutions has been performed using the methods of IR, UV, visible spectroscopy and piezogravimetry. It is shown that formation of two kinds of complexes (both external binding and intercalation) between DNA and ligand L1 are possible. Interaction of phenoxazine rings of ligand into Watson-Crick pairs takes place, probably, selectively for AT- and GC-rich parts of DNA. Thermostability of the DNA - ligand complex is higher than that for pure DNA. The obtained values of physical parameters of interaction of DNA with ligand L1 differ from results obtained earlier for the complex DNA - derivative of actinocin with crown-group.

KEY WORDS: DNA, complex, hydration, spectroscopy, actinocin.

**THE EFFECT OF GAMMA-IRRADIATION AND TEMPERATURE ON BLOOD PLASMA AND
SERUM BY MICROWAVE DIELECTROMETRY**

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

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

e-mail: Vladimir.P.Berest@univer.kharkov.ua

The effect of gamma-irradiation and temperature on structural changes of blood plasma and serum components has been investigated by means of microwave dielectrometry. The temperature dependencies in range of 0 – 70 °C of the real and imaginary parts of permittivity of blood plasma and serum irradiated with doses 10-80 Gy have been obtained. The values of water molecules dipole relaxation activation energy have been calculated. It has been supposed that observed structural transitions in 30 Gy irradiated blood plasma at 37, 42 and 52 °C, which was accompanied by the change of activation energy, are concerned with fibrinogen conformational transitions.

KEY WORDS: blood plasma, serum, γ -irradiation, temperature, dielectric permittivity, activation energy, microwave dielectrometry

**QUANTUM MECHANICAL STUDY OF THE STRUCTURE OF HYDRATED
BISQUATERNARY AMMONIUM COMPOUND DECAMETHOXINUM**

V.A. Pashinskaya, M.V. Kosevich, S.G. Stepanian

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

e-mail: pashinska@ilt.kharkov.ua

Semiempirical quantum mechanical study of structure of complex of the dication of antimicrobial bisquaternary ammonium compound decamethoxinum with 36 water molecules have been carried out by AMI method. It is shown that the structure of hydrated decamethoxinum dication is similar to the most favourable geometry of dication in vacuum, which corresponds to the extended conformation of the central alkyl chain between quaternary nitrogen. The total energy of intermolecular interaction in the decamethoxinum + 36 H₂O complex is -1361,4 kJ/mole. The interaction energy between decamethoxinum dication and water molecules is -528,3 kJ/mole. The calculation of hydrated complex of decamethoxinum dication in bent conformation has shown that the change of geometry of organic dication, corresponding to the bending of central alkyl chain, leads to increase of the total energy of the system. The results of study allowed us to suggest that the main factor of stabilizing of the extended structure of decamethoxinum dication both in the absence of water solvent and in water

surrounding is the electrostatic repulsion between positively charged quaternary ammonium groups.

KEY WORDS: decamethoxinum, hydration quantum mechanical calculations

Ca²⁺ IONS ROLE IN REGULATION OF SMOOTH MUSCLE CONTRACTION AND RELAXATION

N.P. Semenova, T.L. Davydovska, I.B. Phylippov, K.I. Bogutska, M.S. Miroshnichenko

Taras Shevchenko Kyiv National University, 64 Volodymyrska str., Kyiv, 01033, Ukraine

The data on calcium ions (Ca²⁺) role in functional activity of smooth muscle cells (SMC) are reviewed. The mechanisms of Ca²⁺ influx, efflux and translocation inside the cell were considered as well as the mechanisms of above processes modification under the influence of different factors, that helps us to indicate the peculiarities of SMC functional activity in normal and pathological conditions

KEY WORDS: calcium ions, sarcoplasmic reticulum, smooth muscle cell, calcium-induced release of calcium, sparks, spontaneous transient outward current

THE HEAVY METAL ION INFLUENCE ON THE TRANSMEMBRANE POTENTIAL OF THE FISH EMBRYO

N.M. Boyko, D.I. Sanagurski

Department of biophysics and mathematical methods in biology Ivan Franko National University of Lviv, 4 Hrushevsky st., Lviv, 79005, Ukraine

We have investigated the influence of heavy metal ions on dynamics of transmembrane potential of loach (*Misgurnus fossilis* L.) embryos at early stages of development. It is shown that presence of ions of such heavy metals, as cobalt, nickel, manganese, chromium, zinc, tin, cadmium, led to general depolarization of embryo membranes, and also led to decrease of fluctuation frequency of transmembrane potential, that means decrease of frequency of blastomer division, so - delay of embryo development. The amplitude of potential fluctuations also decreases under influence of heavy metal ions and these changes are appeared more expressed with increase of concentration of heavy metal ions in environment of incubation.

KEY WORDS: transmembrane potential, loach embryo, blastomer division, heavy metal ions

TEMPERATURE INFLUENCE ON PROTONS TRANSPORT IN SULFATE-LOADED ERYTHROCYTES

E. B. Almazova, M. H. Rumiekh, V. V. Ramazanov, V. A. Bondarenko

Kharkov National University, 4 Svobody sq, Kharkov, 61077, Ukraine,

Institute for Problem of Cryobiology and Cryomedicine, NAS of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya st., Kharkov, 61015, Ukraine

The temperature dependence of proton transport into a cell and out of a cell in sulfate-loaded erythrocytes is investigated. It was shown that the input of protons into the cell was less sensitive to temperature variation than the output. The activation energy of the protons influx is 1,2 kcal/mol, the activation entropy is negative and makes - 64 kcal/(mol degree). Such differences in values of thermodynamic parameters indicate that transports into the cell and out of the cell are realized by different mechanisms. The obtained results allow to assume that in the first case transport is not accompanied with conformational changes of a carrier, whereas in the second case positive value, of the entropy points at conformational conversions in the carrier structure, which are characteristic to the exchange type of transport.

KEY WORDS: sulfate-loaded erythrocytes proton transport, activation energy

OPTIMAL REGIMEN OF RAPID TWO-STEP FREEZING OF MICE BONE MARROW CELLS

M.V. Ostankov, E.A. Gordienko

Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine, National Academy of Sciences of Ukraine, 23 Pereyaslavskaya St, Kharkov, 61015, Ukraine

Supercooling of intracellular solution of mice bone marrow cells when cooling cellular suspension with a constant rate and at rapid two-step freezing was theoretically calculated. Optimal conditions of low temperature preservation of these cells under dimethylsulfoxide protection were proposed on the base of conducted calculations.

KEY WORDS: rapid two-step freezing, supercooling, intracellular crystallization, dimethylsulfoxide

AN OXYGEN DIFFUSION IN A MALIGNANT TUMOUR AT THE ELEMENTARY STAGE OF ITS DEVELOPMENT (SPHEROID STAGE)

V. G. Knigavko, M. A. Bondarenko, V. G. Buts

Kharkov State Medical University, 4 Lenin ave., Kharkov, 61001, Ukraine

The work is devoted to the mathematical modeling of an oxygen diffusion into the malignant tumour at the elementary stage of its development when tumour can be considered as a spheroid. The purpose of the work was to determine the oxygen distribution in the tumour in dependence on a distance from the spheroids center. Making use of the diffusion equation and the mathematical modeling methods we have obtained three models. They are based on the different suppositions about the way of the oxygen consumption by the tumour. These models let us estimate parameters which characterize the state of the tumour cells, such as the oxygen distribution in the tumour, the radius of the hypoxigen zone, the radius of the spheroid under which the zone forms, etc.

KEY WORDS: mathematical modeling, oxygen diffusion, malignant tumour

SIMULATION OF THE PATHWAY OF RIBOFLAVIN AND FLAVIN COENZYMES BIOSYNTHESIS UNDER THE VARIOUS INTERNAL PARAMETERS

A. Tsymbryk, D. Sanagurski

*Department of biophysics and mathematical methods in biology,
Ivan Franko National University of Lviv, 4 Grushevsky st, Lviv, 79005, Ukraine*

A model of the transitional changes in biosynthesis of riboflavin and flavin coenzymes is constructed based on experimental data collected from investigations of riboflavin metabolism in yeast *Pichia guilliermondii*. Input to the model includes enzyme mechanisms and constants. This transition model reproduced experimentally measured changes in metabolite concentrations over the yeast growth. The real test of a mathematical model is its ability to correctly predict the effects of an altered of environment or mutation. This model demonstrated that ability. The results imply that the model represents many aspects of metabolism in vivo and will provide a means of examining events during of yeast growth.

KEY WORDS: model of metabolism, dynamic of riboflavin biosynthesis

FTIR SPECTROSCOPY STUDIES OF DNA FROM LOW-DOSE IRRADIATED TISSUES

G.I. Dovbeshko¹, E.B. Kruglova², O.P. Paschuk¹, M.Yu. Alesina³, N.A. Karpenko³, A. Mysnyk⁴, M. Novoselets⁴

1-Institute of Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, 46 Nauki ave., Kyiv, 03039, Ukraine;

2-Institute of Radiophysics and Electronics of National Academy of Sciences of Ukraine, 72, Akademika Proskury str, 310085, Kharkov, Ukraine; 3-Chernobyl Scientific and Technical for International Research, 6 Shkolnaya str,

Chernobyl, 255650 Ukraine; 4- Kiev Taras Shevchenko University, 6 Glushkova ave., Kyiv, 01127, Ukraine, e-mail:

gd@iop.kiev.ua

FTIR spectra of DNA isolated from low-dose irradiated epididymis of rats from Chernobyl NPP Exclusion Zone have been investigated in the 500-4000 cm⁻¹. The total absorbed doses were as follows: after 12 months irradiation (12-month rats) - 5 7 and 57 cGy, and after 4 months irradiation (4-month rats) - 0 7, 2 and 25 cGy. Only slight random changes have been observed in the DNA from 4-month rats. More changes have been observed in 12-month rats. Deconvolution and curve decomposition of complex bands as well as an algorithm of neural nets has been applied to the evaluation of the DNA spectra. The probability of the right recognition the irradiated DNA spectra was more than 80%. No correlation of the total absorbed doses with the changes in the spectra has been observed. A modification of bases and sugars as well as a rearrangement of H-bond nets, which can be connected with arising changes in the spatial structure of the DNA takes place in the irradiated DNA. The FTIR data are in the accordance with the data of UV melting curves obtained on the same samples.

KEY WORDS: DNA molecule, FTIR spectra, UV melting curves, Chernobyl NPP Exclusion Zone, low-dose combined irradiation, Kohonen neural net algorithm

AGE PECULIARITIES OF ACTIVATION OF BIOMEMBRANE FREE RADICAL LIPID OXIDATION UNDER ACUTY COOLING OF WHITE RAT ORGANISM

Yu.V. Nikitchenko, *S.E. Ovsyannikov

*V. Karazin Kharkov National University, *Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the National Academy of Sciences of Ukraine*

Effect of acute cooling to state of extreme hypothermia on chemiluminescence intensity and rate of malone dialdehyde accumulation in liver, heart and brain homogenates was studied on male Wistar 3- and 24 - month - old rats. Activation of free radical lipid oxidation in all studied organs was shown to take place by 3 and 24 hours of postcooling period. Strict correlation between date obtained by two independent methods was established. Obtained results about more expressed activation of lipid peroxidation in old animals testify to urgent necessity of taking into account the age aspect during elaboration of methods and means of cooling trauma treatment.

KEY WORDS: lipid peroxidation, rapid cooling, age.

DOPPLER ULTRASOUND DETECTION OF SHEAR DEFORMATION IN SOFT TISSUE INDUCED BY FOCUSED ULTRASOUND

E.A. Barannik, S.A. Girnyk, D.A. Tolstoluzhskiy, V.V. Tovstyak, A.I. Marusenko*, S.Y. Emelianov**, A.P. Sarvazyan***

Kharkov National University, Physical-technical department, 31 Kurchatov av., Kharkov, 61108, Ukraine;

**Biomedical Engineering Department, University of Michigan, 2350 Hayward Street, Ann Arbor. MI 48109;*

***JSC Research and Development Institute of Radio Engineering Measurements, 271 Acad Pavlov str., Kharkov, 61054, Ukraine; ***Artann Laboratories, 1 Riva Avenue, North Brunswick, NJ 08902*

Spatial distribution of displacement in soft tissue models caused by radiating pressure of focused pulse ultrasonic radiation, being by a basis developed SWEI a method of definition of tissue elastic properties is investigated. Bidimensional structures of amplitudes of local displacement of media and spatial dynamics of shift waves distribution are received. It is shown that for used values of intensity and duration of stimulating pulses the received amplitudes of displacement of environment in the phantom of the tissue are in good conformity with available theoretical estimations. Measurements of amplitudes of displacement of the tissue were earned out by ultrasonic Doppler method.

KEY WORDS: soft tissue phantom, shear wave, focused ultrasound, tissue displacement, Doppler, elasticity, SWEI

PROGRESS OF MASS SPECTROMETRIC TECHNIQUE FOR BIOMEDICAL EXPERIMENTS AS AN EXAMPLE OF INFLUENCE OF SOCIAL DEMANDS ON THE ADVANCEMENT OF SCIENCE

M.V. Kosevich, V.S. Shelkovsky

*B. Verkin Institute for Low Temperature Physics and Engineering of the National Academy of Sciences of Ukraine,
47 Lenin Ave., Kharkov, 61164, Ukraine, e-mail: mvkosevich@ilt.kharkov.ua, shelkovsky@ilt.kharkov.ua*

The aim of the present review was to analyse the mutual effect of the development of human society and progress of certain branches of science on the example of mass spectrometry as one of the rapidly evolving methods of molecular biological and biophysical research. Brief overview of the evolution of the technique of mass spectrometric experiment over the XXth century in dependence of social demands which orientation has been shifted from a predominance of the military needs in the middle of the century to research which provide human welfare and health in the nineties, from purely fundamental physical problems to medico-biological tasks. The main achievements of the method are listed, among which the most significant is the realization of a possibility to study high molecular weight biopolymers. On the basis of analysis of the tendencies of development of the method the conclusions concerning the most promising directions of investigations employing up-to-date achievements of mass spectrometric technique are made. A systematization of literature sources on the problem in question is presented to promote information search.

KEY WORDS: mass spectrometry, biophysics, experimental techniques, history of science

NEW METHOD OF DETERMINING THE MEAN TRANSIT TIME OF RADIOACTIVE PHARMACEUTICAL PREPARATIONS IN KIDNEYS

V. Knigavko, V. Lesovoi, E. Radzishvskaya, N. Pilipenko, A. Arsenyev, A. Knigavko

Kharkov State Medical University, 4 Lenin ave., Kharkov, 61001, Ukraine;

Grigoriev Institute for Medical Radiology, 82 Pushkinskaya st., Kharkov, 61024, Ukraine

The problem of increasing of information capacity for radionuclide dynamic diagnostics is considered. Methods of mathematical simulation of radiopharmaceutical transportation in the human body are used. A new method of determining the mean transit time of radioactive pharmaceutical preparations in kidney by the method of dynamic radionuclide diagnostics is dealt with in the article. A three-detector (for one kidney) and five-detector (for two kidneys) method of registration are suggested. The detectors are positioned above the area of brain, as well in necessary zone in front of and behind the patient. The results of measurements are proceed on a method of the least squares.

KEY WORDS: dynamic radionuclide diagnosis, mathematical simulation, radiopharmaceutical transportation, radionephrography

APPLICATION OF A HOLOGRAPHIC INTERFEROMETRIC MICROSCOPY METHOD FOR INVESTIGATION OF OZONE THERAPY INFLUENCE ON SHAPES OF BLOOD ERYTHROCYTES

Tishko T.V., Titar V.P., Barhotkina T.M.*, Naboka A.M., Nekrasov V.L., Kud A.A.**

Kharkov National University, 4 Svoboda sq, Kharkov, 61077, Ukraine

**Kharkov State Medical University, 4 Lenin ave., Kharkov, 61001, Ukraine*

***Kharkov Regional Clinical Hospital, 13 Pravda ave., Kharkov, 61001, Ukraine*

Experimental results on application of a method of holographic interferometric microscopy for investigation of ozone therapy influence on shapes of blood erythrocytes of a healthy person and patients with neurosensor hardness of hearing are presented. It is shown that ozone therapy causes normalization of erythrocytes shapes of patients and gives positive medical effect. It is shown that the method is effective for the purposes of biomedical diagnostics of different diseases.

KEY WORDS: ozone therapy, neurosensor hardness of hearing, holography, interferometry, microscopy, erythrocyte

Наукове видання "Біофізичний вісник".

Підписано до друку 24.11.00. Формат 60x84 1/8. Умов. друк. арк. 7,08.

Облік.-вид. арк. 9,75. Тираж 200. Ціна договірна.

3-60

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

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

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

BIOPHYSICAL BULLETIN

Contributions written in English, Ukrainian or Russian should be sent to one of the members of the Editorial Board or to the Editorial Office in duplicate with electronic version on 3,5 inch diskette. By submitting a paper for publication in Biophysical Bulletin the authors imply that the material neither has been published previously nor has been submitted for publication elsewhere and that the authors have obtained all the necessary authority for publication. A camera-ready manuscript (ready for photocopying) should be typed in single spacing on good quality white paper (A4 format), one side only, preferably using inkjet or laser printer. Use the MS Word with following options 10 points Times New Roman font, text justified. Left and right margins should be 2,5 cm, upper margin should be 3 cm, and bottom one should be 2 cm. All pages should be numbered serially on the backside in pencil.

Mathematical and chemical symbols, equations, and formulae should be inserted in the text by computer means. Camera-ready figures should be computer-generated or produced in black ink with printed symbols labeling axes. The font size of figure legends should be 9 points. Formulae, tables, figures should be numbered consecutively using Arabic numerals, e.g. (1), Table 1, Fig 1.

Layout of the Manuscript

Leave four first lines blank on the first page. The title of the paper should appear in capital letters (12 pt, bold, centered) on the fifth line. After one blank line type initials and surnames of the authors (12 pt, bold, centered). On the next line type affiliations and full addresses including e-mail addresses of the authors (9 pt, Italic, centered). Then, place the date of the paper submission month, day, year (9 pt, centered).

After one blank line place abstract (9 pt) of the paper, from 6 to 12 lines. The abstract should contain the brief overview of the problem; method used in the paper, and main results and conclusions. The word "Abstract" should be omitted.

On the next line type 5-8 key words (9 pt, the heading "KEY WORDS" should be typed in bold capital letters in the beginning of the line) The text of the abstract and key words should be indented 0,5 cm from the left and right margins.

Then, leave one blank line before starting to type the text of the paper. The first line of each paragraph should be indented 0,75 cm from the left margin. It is recommended to divide the text into following sections introduction (heading of this section should be omitted), **MATERIALS AND METHODS** (obligatory for experimental studies), **RESULTS AND DISCUSSION**, **CONCLUSIONS** (headings of sections should appear in capital letters and be centered). For theoretical studies less specified text organization is envisaged, e.g. instead of section **MATERIALS AND METHODS**, the sections **PROBLEM FORMULATION** or **MODEL** are recommended, etc. The sections are not numbered. Sections may be subdivided in subsections, if necessary. Subsection Headings are centered and should be bold and capitalized. Leave one blank line after every section or subsection. After headings of sections and subsections a point should be omitted.

Any acknowledgement regarding support, such as names of the foundations and grant numbers should be included at the end of the text after one blank line. References to the literature should be cited in the text consecutively by Arabic numerals in square brackets. The citation of unpublished papers is prohibited. A full list of the references should be given at the end of the manuscript as a separate section.

On the additional separate sheet with left and right margins of 2,5 cm, upper margin of 3 cm, and bottom margin of 2 cm the abstract in English should be submitted. The word "Abstract" should be omitted. On the first line type the paper title (capital letters, bold, 10 pt). On the next line place initials and surnames of the authors (centered, bold, 10 pt). On the next line type affiliations and full addresses including e-mail addresses of the authors (9 pt, Italic, centered). After one blank line place the text of the abstract (Justified, 9 pt, no indent). On the next line after heading "KEY WORDS" (capital letters, bold, 9 pt) type key words (justified, 9 pt). Please, pay attention to compact organization of the manuscript.

Manuscripts that do not correspond to the instructions above will not be considered for publication.