МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
им. М.В. Ломоносова

На правах рукописи

КОЗЛОВА

Елена Карловна

КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ИЗЛУЧЕНИЯ И ИМПУЛЬСНОГО ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА БИОЛОГИЧЕСКИЕ МЕМБРАНЫ

01.04.16 – физика атомного ядра и элементарных частиц

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
доктора физико-математических наук

Москва-2005

Работа выполнена в Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова

Научные консультанты:

Доктор физико-математических наук, профессор — Черняев Александр Петрович

Доктор биологических наук, профессор — Антонов Валерий Федорович

Официальные оппоненты:

Доктор физико-математических наук, профессор — Твердислов Всеволод Александрович

Доктор физико-математических наук, профессор — Рууге Энно Кустович

Доктор биологических наук, профессор — Мазурик Виктор Константинович

Ведущая организация:

Объединенный институт ядерных исследований
Лаборатория радиационной биологии, г. Дубна

Защита состоится 22 декабря 2005 года в 15[30] на заседании диссертационного совета Д.501.001.65 на биологическом факультете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу:
119992, Москва, Ленинские горы, биологический факультет, аудитория _____.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ

Автореферат разослан « 18 » ноября 2005 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук,
профессор — Кольс О.Р.

2007-4
7643

2406541

Общая характеристика работы

Актуальность работы

Изучение механизмов взаимодействия ионизирующих излучений с веществом различной структурной организации является одной из важных проблем ядерной физики. Особую значимость имеет изучение закономерностей взаимодействия радиации с живыми биологическими объектами, элементарную основу которых составляют клетки.

В настоящее время наименее изученными остаются физические процессы в структурно сложных субклеточных образованиях, в частности, в клеточной мембране, рассматриваемой в последнее время, наряду с ДНК, в качестве критической мишени радиационного воздействия. При этом актуальным является исследование физических аспектов формирования радиационного повреждения биологических мембран при действии γ-излучения и потоков электронов. Невыясненными остаются механизмы повреждения структуры мембран; отсутствуют точные количественные данные для оценки эффектов воздействия излучений в различных дозах на биологические мембраны.

Поэтому исследование влияния ионизирующего излучения на структурные и функциональные характеристики биологических мембран является актуальной междисциплинарной проблемой ядерной физики, радиобиологии, биофизики.

Для изучения физических процессов, инициируемых воздействием излучения, ядерно-физические методы используются как самостоятельно, так и в сочетании с другими физическими методами, что позволяет проявить эффекты, вызываемые действием ионизирующего излучения. Это актуально в настоящее время для выявления радиационных нарушений в биологических мембранах, в частности, путем воздействия на клетки разнородных физических факторов: ионизирующего излучения, импульсного электрического поля, химических агентов - как по отдельности, так и в различных их комбинациях.

Для эффектов воздействия ионизирующих излучений на биологические объекты характерно появление скрытых повреждений. Такие повреждения могут на протяжении длительного времени не обнаруживать себя изменением функционального состояния биологических объектов разной степени сложности. Для выявления скрытых радиационных повреждений используют различные методы, включая дополнительные воздействия, в результате которых такие повреждения становятся явными. Разработка методов выявления и количественного анализа скрытых повреждений в биологических мембранах особенно важно для исследования механизмов действия γ-излучения в малых дозах (до 10 сГр).

...ьная
...-ка
...збург
2007 РК

Вместе с тем эта задача актуальна и для исследования радиационных эффектов облучения в высоких дозах. Потоки частиц, в частности, электроны, могут создавать в биологических структурах дозы облучения 2000 Гр и более. И в этих случаях остаются не ясными механизмы и степень эффективности действия таких излучений на мембраны.

Поэтому создание способов, позволяющих исследовать действие ионизирующих излучений в широком диапазоне доз на мембраны является актуальной задачей современной ядерной физики.

Целью работы является экспериментальное исследование действия γ-излучения в малых (до 10 сГр) дозах и пучков электронов в больших (2000 Гр и более) дозах на биологические мембраны на основе комбинированного действия излучения и импульсного электрического поля.

Научная новизна работы

1. Исследованы особенности комбинированного действия ионизирующих изучений (γ-излучение в малых дозах, 0,5 – 10 сГр, и пучки электронов в дозах 2000 – 13400 Гр) и импульсного электрического поля на мембраны эритроцитов человека в суспензии. Показана неаддитивность констант скоростей гемолиза эритроцитов в суспензии в результате комбинированного воздействия указанных факторов.

2. Предложен метод детектирования γ-излучения и пучка электронов с помощью калиброванной необратимой электропорации биологических мембран.

3. Выявлены скрытые повреждения биологических мембран, возникающие в результате воздействия на них γ- излучения в малых дозах. Исследована и установлена зависимость степени повреждения мембраны от дозы излучения (0,5 – 10 сГр).

4. Обнаружены скрытые повреждения биологических мембран после воздействия на них пучка электронов в высоких дозах (2000 – 13400 Гр). Исследована и установлена зависимость степени повреждения мембран от дозы излучения.

5. Экспериментально показано, что при действии пучка электронов в диапазоне доз 7000 – 13000 Гр порог электропорации мембран при действии импульсного электрического поля уменьшается на 11 – 16%.

6. Создана экспериментальная установка для изучения действия излучений на мембраны, включающая в себя разрезной

микротрон импульсного действия (НИИЯФ МГУ), контейнеры для источников γ-излучения, прибор для электропорации биологических мембран, регистрирующий фотоколориметр, устройство для размещения модельных биологических объектов облучения.

7. Разработана методика для исследования скрытых повреждений в мембранах, возникающих при действии γ-излучения и пучка электронов. Экспериментально установлены параметры калиброванного электрического импульса для необратимого пробоя мембран (длительность, амплитуда) и параметры биологической модели (концентрация клеток, температура).

8. Предложен метод количественного анализа повреждающего действия ионизирующих излучений и других физико-химических факторов на мембрану in vitro и in vivo, на основе кинетики уменьшения числа эритроцитов в суспензии после необратимой электропорации клеточной мембраны.

9. Разработана математическая модель для описания механизмов действия γ-излучения и пучка электронов на биологические мембраны в сочетании с действием импульсного электрического поля, в которой:

- мембрана представляется в виде статистического ансамбля участков (активных центров) с различными пороговыми потенциалами электрического пробоя; воздействие γ-излучения и пучка электронов изменяет параметры статистического ансамбля и, соответственно, условия электрического пробоя;
- проведена оценка средней длины трека вторичных электронов и эффективного числа активных центров повреждения в мишени с учётом статистического веса атомов, составляющих биологическую систему;
- решена обратная задача вычисления параметров статистического распределения порогового потенциала электрического пробоя после воздействия излучений.

10. Показана универсальность предложенного метода для диагностики состояния мембран после воздействия различных физико-химических факторов: ультрафиолетовое излучение, фармакологические препараты (на примере перфторана), электрические импульсы разной полярности, для доноров различных возрастных групп.

Достоверность научных результатов и выводов обеспечена использованием хорошо апробированных методик, строгим соблюдением условий экспериментов, высокой степенью воспроизводимости опытных

данных. Полученные новые данные согласуются с современными представлениями по рассматриваемой проблеме.

Практическая и научная ценность работы

Предложенный метод исследования действия излучений на биологические мембраны в сочетании с импульсным электрическим полем может быть применен в биофизических экспериментах по изучению действия ионизирующего излучения на биологические мембраны как in vitro, так и in vivo. Данный метод может быть использован в практической медицине: для мониторинга за состоянием эритроцитов в ходе лучевой терапии, при выборе оптимальных характеристик электрического импульса для дефибрилляции сердца, при изыскании оптимальных искусственных кровезаменителей в хирургии, для оптимизации условий консервации и хранения крови. Предложенная модель может быть использована для оценки и количественного анализа степени повреждающего воздействия γ-излучения и пучка электронов на мембраны.

Результаты, полученные в диссертации, могут быть включены в программу обучения студентов высших учебных заведений, специализирующихся в области ядерной физики, биофизики, медицины.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Физический метод детектирования γ-излучения, пучков электронов и других ионизирующих излучений на основе последующей необратимой электропорации биологических мембран экспоненциальным электрическим импульсом длительностью 10 мс.

2. Константа скорости уменьшения числа эритроцитов в суспензии при комбинированном воздействии γ-излучения, пучка электронов и импульсного электрического поля не является суммой констант скоростей при действии этих же факторов по отдельности, что указывает на синергический механизм, лежащий в основе наблюдаемых эффектов.

3. Разработанный метод исследования результатов воздействия ионизирующих излучений на биологические мембраны с помощью калиброванного импульсного электрического поля позволяет оценивать скрытые повреждения мембран эритроцитов через 1-30 мин после воздействия in vitro γ-излучения в малых дозах (0,5–10 сГр), пучка электронов в больших дозах (2000 – 13400 Гр).

4. В результате действия ионизирующих излучений на мембраны уменьшается пороговый потенциал их электрического пробоя.

5. Предложенная математическая модель описывает механизмы действия γ-излучения и пучка электронов в сочетании с импульсным электрическим полем на мембраны. Биологическая мембрана представлена в виде статистического ансамбля ее участков с различными пороговыми потенциалами электрического пробоя. Воздействие γ-излучения и пучка электронов приводит к изменению параметров исходного статистического ансамбля и к возникновению дополнительных активных центров электрохимических процессов на границе раздела «раствор-мембрана».

   Модель позволяет:

– количественно оценить степень воздействия γ-излучения в малых дозах (до 10 сГр) и пучка электронов в высоких дозах (2000 Гр и более) ;

– решить обратные задачи оценки изменений собственных параметров системы в результате воздействия пучка ускоренных электронов и γ-квантов: порогового напряжения электрического пробоя, количества пор и их радиусов на разных сторонах клетки, уменьшение величины поверхностного заряда эритроцита.

6. Предложенный метод позволяет оценить степень воздействия на мембраны ультрафиолетового излучения, перфторуглеродных соединений в разных концентрациях (1-100 мкл/мл суспензии), последовательных электрических импульсов разной полярности, оценить влияние на состояние клеточных мембран возраста доноров (от 25 до 70 лет).

Апробация работы. Основные положения и результаты диссертационной работы были представлены и обсуждены на следующих форумах: XII Всесоюзная конференция по когерентной и нелинейной оптике (Москва, 1985); Международная школа «Проблемы теоретической биофизики» (Москва, 1998); конференция «Физические проблемы экологии (физическая экология) (Москва, 1999); II и III Съезды биофизиков России (Москва, 1999; Воронеж, 2004); I и II Евразийский конгрессе по медицинской физике (Москва, 2001, 2005); Second and Third International Summer Student School "Nuclear Physics Methods and Accelerators in Biology and Medicine (Poznan, Poland, 2003; Дубна, 2005); Конференция по использованию ядерно-физических методов в медицине (Москва, 2003); конференция "Основные общепатологические и клинические закономерности развития критических, терминальных и постреанимационных состояний. Принципы их коррекции" (Москва, 2003); Международная конференция «Критические технологии в реаниматологии» (Москва, 2003); XI Российский национальный конгресс «Человек и лекарство» (Москва, 2004); V и VI межвузовская научная школа молодых специалистов конференции «Реаниматология. Ее роль в современной медицине» (Москва, 2004); V и VI Межвузовская научная школа молодых специалистов «Концентрированные потоки энергии в

космической технике, электронике, экологии и медицине» (Москва, 2004, 2005); Российская научная конференция «Перфторуглеродные соединения в экспериментальной и клинической медицине (Санкт-Петербург, 2004); третий Российский Конгресс по патофизиологии с международным участием (Москва, 2004); Ломоносовские чтения (Москва, 2005); European Association for Red Cell Research ,15th Meeting (Murten, Switzerland, 2005); Всероссийская конференция «Радиобиологические основы лучевой терапии» (Москва, 2005).

Работы в данной области поддержаны грантом Правительства Москвы (2002), грантом Программы «Университеты России» (2004).

Под руководством автора защищено 5 дипломных работ на физическом факультете МГУ.

Автор читает курс физики на кафедре медицинской и биологической физики ММА им.И.М.Сеченова и специальный курс «Биофизические основы физиологических процессов» на кафедре физики ускорителей высоких энергий физического факультета МГУ. Лекции по теме диссертации читаются автором и на ежегодной (1998 – 2005) летней практике студентов в ОИЯИ, г. Дубна.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 33 научные работы, в том числе: в соавторстве 1 учебник «Биофизика» для студентов высших учебных заведений (с грифом Министерства образования Российской федерации, 1-е и 2-е издания), учебное пособие «Практикум по биофизике» (с грифом УМО) и 27 статей, в том числе в журналах «Биофизика» (1), «Бюллетень экспериментальной биологии и медицины» (2), «Биомедицинские технологии и радиоэлектроника» (1), «Вестник МГУ. Физика и астрономия» (4), «Патологическая физиология и экспериментальная терапия» (2), «Радиационная биология. Радиоэкология» (1), «Анестезиология и реаниматология» (1), «Медицинская физика» (6), «Квантовая электроника» (3), «American Journal of Physiology» (1), «Advances in Physiology Education» (1), «Appl. Physics» (1), «Известия АН, сер. физ.» (1), «Общая реаниматология» (2).

Личный вклад автора. В основе диссертации - результаты исследований, выполненных автором в Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова, в НИИЯФ им. Д. В. Скобельцына МГУ, НИИ общей реаниматологии РАМН. Постановка экспериментальных и теоретических задач предложены лично автором. Экспериментальные исследования проведены на разрезном микротроне Отдела электромагнитных процессов и взаимодействий с атомными ядрами НИИЯФ и на кафедре медицинской и биологической физики ММА им. И.М.Сеченова при непосредственном участии автора.

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, шести глав текста, заключения, списка литературы, двух приложений, всего на 284 страницах, включая 119 рисунков и 10 таблиц. Список литературы включает 245 наименований.

Содержание работы

Во введении сформулирована цель, показана актуальность и практическая значимость работы для применения ядерно-физических методов в научных исследованиях и медицине.

В **первой главе** дан обзор работ, в которых приведены результаты экспериментальных и теоретических исследований по проблеме действия ионизирующего излучения и импульсного электрического поля на биологические мембраны. Известно, что применение ионизирующего излучения в биологии и медицине сопряжено с необходимостью окончательного определения вклада в конечный радиобиологический эффект повреждения молекулярных мишеней, среди которых в последнее время все большее внимание привлекают клеточные мембраны. Роль биологической мембраны как объекта воздействия γ-излучения, пучков электронов, протонов и др. продолжает активно дискутироваться в научной литературе (Benderitter, 2003; Кудряшов, 2004). Удобным объектом для экспериментального разрешения дискуссионных вопросов в этой области являются эритроциты. Одной из трудностей исследования клеточных мембран названных клеток является их сложный химический состав с включением липидов, а также структурных и ферментных белков. Известно много фактов структурных изменений биологической мембраны эритроцитов под воздействием излучений: уменьшение связи гемоглобина с мембраной эритроцита при увеличении дозы от 10 до 10^3 Гр (Древаль и др., 2000), повреждение спектрина при прямом действии ускоренных электронов на мембраны эритроцитов человека (Neamtu и др., 1999), изменение подвижности липидов (Petcu, 1997), структурные изменения в мембранных белках, изменение клеточной морфологии в результате воздействия на эритроциты рентгеновского (Schuurhuis и др., 1984) и γ-излучения (Jin и др., 1997). Предполагается, что общие структурные изменения под действием излучения в дозе 0,004 – 1000 Гр на тени эритроцитов определяются полифазными изменениями многих параметров: липидной микровязкости мембран, подвижности белков в мембране, поверхностного потенциала и интенсивности перекисно-окислительных процессов в липидах. Изучается влияние фракционирования дозы на повреждение мембранных липидов и метгемоглобина эритроцитов по сравнению с однократным облучением в той же дозе 2,2 кГр. Показано, что расщепление (фракционирование) дозы не

влияет на разрушение мембранных белков (Zaborowski и др., 1997; Koziczac и др., 1999, 2003).

Индуцирование модификации мембраны под действием излучения предлагается рассматривать как основу для создания биоиндикаторов оценки дозы радиационного воздействия (Benderitter, 1999; Gong, 1999 ; Lenarczyk, 2001).

Эффекты ионизирующего излучения проявляются не только на клеточном уровне, но и на уровне ткани. γ -излучение вызывает нарушение структуры тканей, проявляющееся, в частности, отеком и эритемой (Hanning, 2000). В головном мозге кролика после γ-терапии в дозе 50 – 120 Гр наблюдаются гистологические изменения: сужение просвета артериол, изменение структуры микрососудов (Kamirio, 1996; Kiani, 2000).

Для проявления эффектов биологического действия ионизирующего излучения характерен скрытый (латентный) период, длительность которого зависит от уровня организации биологических объектов. Он может варьировать в зависимости от дозы облучения, тканевой радиочувствительности, радиочувствительности организма и выбранной для наблюдения функции. При дополнительных воздействиях, например, при повышении парциального давления кислорода, при нагревании скрытое повреждение может проявляться. Для выявления скрытых повреждений используются различные методы: метод ЭПР, метод привитой сополимеризации (Козлов, 1965), дополнительное воздействие ультрафиолетового излучения для выявления скрытых радиационных повреждений кристаллинов в хрусталике глаза (Красавин и Островский, 2003, 2004).

Выявление скрытых повреждений в биологических мембранах особенно важно при исследовании механизма действия ионизирующей радиации в малых дозах на биологические объекты. При этом физические процессы могут не только приводить к формированию структурных повреждений, но и инициировать цепи биологических реакций, приводящих к дальнейшему изменению структуры и функций биологических мембран. Изучены структурные характеристики ядерных, митохондриальных, синаптических, эритроцитарных и лейкоцитарных мембран. Для оценки функциональной активности клетки рассматривали продукцию активных форм кислорода, состав и антиокислительную активность липидов вышеперечисленных мембран, а также чувствительность клеток, мембран, ДНК, организма к действию дополнительных повреждающих факторов (Бурлакова , Пелевина, Спитковский, Мазурик, 1994 -2005). Проведен анализ проблемы пересечения клетки единичными треками ионизирующих частиц при облучении в малых дозах (Спитковский, 2004).

Проблема изменения структуры биологических мембран обсуждается и при исследовании действия на них импульсного электрического поля. Такому воздействию мембраны подвергаются с целью их электропорации для ввода в клетку лекарственных веществ, различных генов (Mangal and Kaur,1991; Zhang et al., 1996; Vanbever, 1999; Golzio et al., 2001; Blomberg и др., 2002;

Gehl, 2003). Электропорации подвергаются как мембраны клеток, так и искусственные мембраны (Weaver and Chizmadzhev, 1996). Отмечается принципиальное сходство в эволюции липидных пор, возникающих при электропорации и фазовом переходе липидов в плоских бислойных липидных мембранах – мягкая порация (Антонов и и др, 1992 - 2005). Экспериментальные факты свидетельствуют о том, что на результат электропорации влияют не только электрические параметры воздействия (напряженность электрического поля, длительность импульса), но и другие факторы, которые могут изменить порог электропорации (Troiano et al., 1998; Tung et al., 1999; Koronkiewicz et al., 2001; Kanduser et al., 2003). Экспериментально показано, что результаты электропорации мембраны клетки асимметричны со стороны катода и анода (Sowers and Lieber, 1986; Hibino and Kinosita, 1993; Gabriel и др., 1999; Tekle et al., 2001). Комлексная зависимость результатов электропорации от напряженности поля, длительности и количества импульсов представлена в ряде работ (Canatella, 2001; Яковенко, 2004).

Многообразие биофизических явлений при электропорации и ее практическая значимость определяет научный интерес к изучению механизмов электрического пробоя искусственных биологических мембран (Chernomordik et al.,1983; Chernomordik and Chizmadzhev,1989; Weaver and Chizmadzhev, 1996; De Bruin and Krassowska, 1999).

В ряде практических задач ядерной физики, радиобиологии, медицины необходимо использование комбинированного действия электрического поля и ионизирующего излучения на изучаемый биологический объект (Daila и др., 2004; Li, 2004). Экспериментально показано, что радиочувствительность клеток изменяется в результате электропорации (West , 1992). Комбинированное действие потока нейтронов, химического агента и электрического поля на мембраны обсуждается в работе (Ono K. и др., 1998). Ионизирующее излучение, импульсное электрическое поле и цисплатин используют для задержки роста опухоли или достижения локального излечения (Sersa et al, 2000).

К анализу сложных системам принято подходить с позиции самоорганизации (Твердислов и Яковенко, 2001). Мембрана представляет собой сложную высокоорганизованную систему. Поэтому при анализе процессов в ней при комбинированном воздействии разнородных факторов необходимо учитывать синергетические принципы.

Вторая глава посвящена методике проведения экспериментов.

В экспериментах использовали пучок электронов импульсного разрезного микротрона НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына с максимальной энергией электронов 70 МэВ. Характеристики пучка электронов: энергия электронов 40 МэВ, длительность импульсов 5 мкс, частота следования импульсов 10 Гц, значение тока в импульсе 0,7 - 1 мА.

В качестве источника γ-излучения использовали $_{88}{}^{226}Ra$. В диссертации приведена схема распада $_{88}{}^{226}Ra$ до стабильного ^{206}Pb. Радионуклид $_{88}{}^{226}Ra$

является источником γ-излучения за счет дочерних нуклидов, возникающих при последующих распадах в данном ряду. Приведены спектральные линии γ –излучения. Из приведённых данных следует, что основные интенсивности γ -излучения приходятся на 0,295; 0,352 и 0,61 МэВ. В опытах использовали ^{226}Ra-источники с активностью 9,25 мКи и 2,04 мКи (соответственно $34{,}23 \cdot 10^7$ и $7{,}55 \cdot 10^7$ Бк).

В наших экспериментах использовали воздействие γ-излучения и пучка электронов на мембраны как по отдельности, так и в сочетании с импульсным электрическим полем.

В качестве основного объекта исследования были выбраны эритроциты человека, а основным исследуемым явлением был индуцируемый указанными физическими воздействиями гемолиз эритроцитов, в основе которого лежит нарушение барьерной функции мембраны.

На рис. 1 представлена общая схема проведения опытов по комбинированному воздействию γ-излучения, пучка электронов и импульсного электрического поля. В качестве экспериментальной модели использовали суспензию эритроцитов человека в пропорции 0,05 мл крови в 1 мл 0,9 % раствора хлористого натрия. Эффект воздействия оценивали по скорости уменьшения числа эритроцитов в суспензии в результате гемолиза.

Информацию о количестве эритроцитов, находящихся в данный момент времени в суспензии, получали, измеряя оптическую плотность раствора D с помощью фотоэлектроколориметра. При длине волны света 760 нм пропускание света через раствор определяется рассеянием на эритроцитах. Тени эритроцитов, образующиеся после гемолиза, другие форменные элементы крови, гемоглобин вносят вклад в оптическую плотность не более 3%. Поэтому именно уменьшение количества эритроцитов в результате их гемолиза $n(t)$ приводит к уменьшению оптической плотности суспензии $D(t)$.

При малой концентрации раствора наблюдается линейная зависимость $D(t)=\kappa n(t)$, где κ - коэффициент пропорциональности. График зависимости $n(t)$ (соответственно $D(t)$) назван кинетической кривой уменьшения числа эритроцитов (или кинетической кривой гемолиза). На всех этапах эксперимента одновременно контролировали оптическую плотность контрольной суспензии.

В каждом опыте проводили количественный анализ кинетической кривой: на основе изменения количества клеток $n(t)$ рассчитывали константу скорости уменьшения числа клеток β, определяли остаточный уровень $n_{ост}$. На рис. 1 представлена кинетическая кривая уменьшения числа эритроцитов после воздействия импульсного электрического поля. Кинетическая кривая описывается сигмоидальной функцией. При этом для анализа и сравнения опытных данных ее можно представить на выделенных временных интервалах как экспоненциальную зависимость (рис. 1, IV) : $n(t) = n_0 \exp(-\beta t) + n_{ост}$. Здесь β – константа скорости уменьшения числа эритроцитов, n_0 – начальное число эритроцитов.

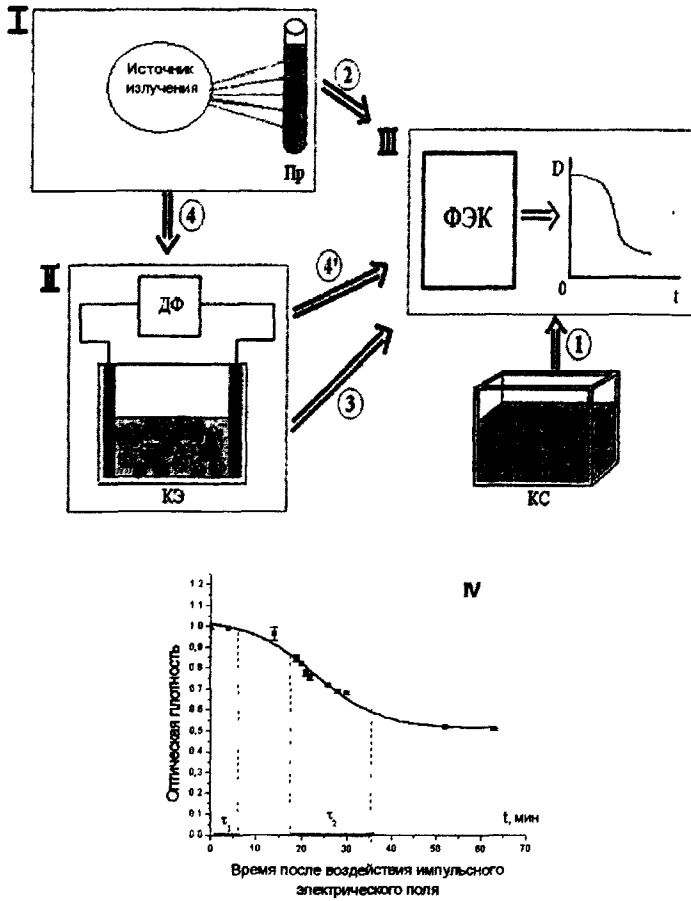


Рис.1 . Схема экспериментов. I этап – воздействие на суспензию γ- излучения ^{226}Ra-источника или пучка электронов, II этап – воздействие на суспензию импульсного электрического поля, III этап – измерение оптической плотности суспензии . Пр – пробирка с суспензией, ДФ – дефибриллятор, ФЭК – фотоэлектроколориметр, КС – контрольная суспензия, КЭ – кювета экспериментальная (с суспензией и электродами) IV этап - построение кинетических кривых· 1 – для контрольной суспензии, 2 – для облученной суспензии, 3 – для суспензии после воздействия импульсным электрическим полем, 4–4' – для суспензии после комбинированного действия

При анализе опытных данных оценивали длительность промежутка времени τ_1 , на котором $\beta=0$, оценивали максимальное значение $\beta_{макс}$ (на рис. 1 $\beta_{макс}$ – на участке τ_2), а также сопоставляли β на выбранном промежутке времени после облучения или электропорации.

В качестве источника импульсного электрического поля применяли клинические дефибрилляторы *«Lifepak» 7 (США) и «ДИ-03» (РФ)*. Разность потенциалов подавали на титановые электроды, которые помещали в кварцевую кювету. При отработке условий эксперимента была проведена проверка однородности электрического поля в суспензии и более 800 опытов по отработке рабочих параметров калиброванного импульсного электрического воздействия. Оптическая плотность 5 мм слоя клеточной суспензии равнялась 1. Опыты проводили через 1 час после приготовления суспензии. Во всех опытах суспензию термостатировали при температуре 20 ^{0}С. Перед проведением каждого этапа эксперимента суспензию перемешивали.

На рис. 2 представлены результаты опытов по определению порога электропорации эритроцитов в суспензии. В качестве рабочей точки выбрана разность потенциалов между электродами U=2900 В, расстояние между электродами 1,7 см. Длительность импульса 10 мс. При этих параметрах происходит необратимая электропорация мембран эритроцитов. Импульс с данными параметрами в дальнейшем будем называть калиброванным.

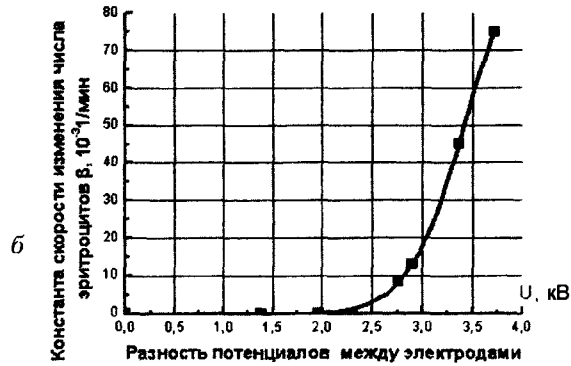


Рис. 2. Кинетические кривые гемолиза при различных напряжениях между электродами (а) и зависимость константы скорости гемолиза β от разности потенциалов U на промежутке времени от 0 до 100 мин (б)

В модельном эксперименте на бислойных липидных мембранах были измерены флуктуации токов и оценены радиусы пор при различных температурах в области фазового перехода. Показано, что при рабочей температуре ниже точки фазового перехода в мембранах могут возникать активные центры электрического пробоя.

В **третьей главе** приведены результаты экспериментального исследования комбинированного действия γ-излучения источника ^{226}Ra и импульсного электрического поля на мембраны эритроцитов. Для облучения суспензии в центр металлического контейнера помещали колбу с радионуклидом ^{226}Ra, пробирки с суспензией размещали на расстоянии 30 мм от источника. Мощность дозы γ-излучения используемых источников равнялась соответственно 1,25 и 5 сГр/час. Время облучения варьировали от 20 с до 2 часов. На рис. 3 и 4 представлены результаты опытов, в которых наблюдали гемолиз, оцениваемый по уменьшению числа эритроцитов в облученной и в контрольной суспензиях.

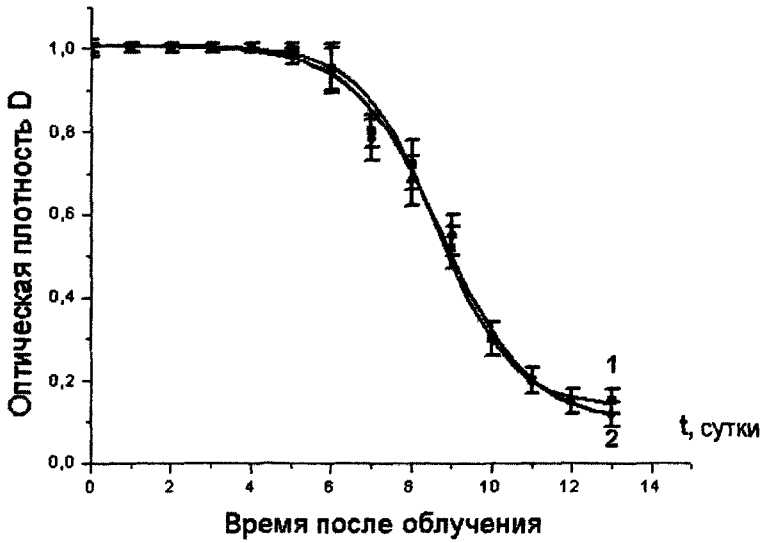


Рис. 3. Зависимость оптической плотности суспензии от времени после воздействия γ-излучения в дозе 5 сГр (2) и в контрольной суспензии без облучения (1)

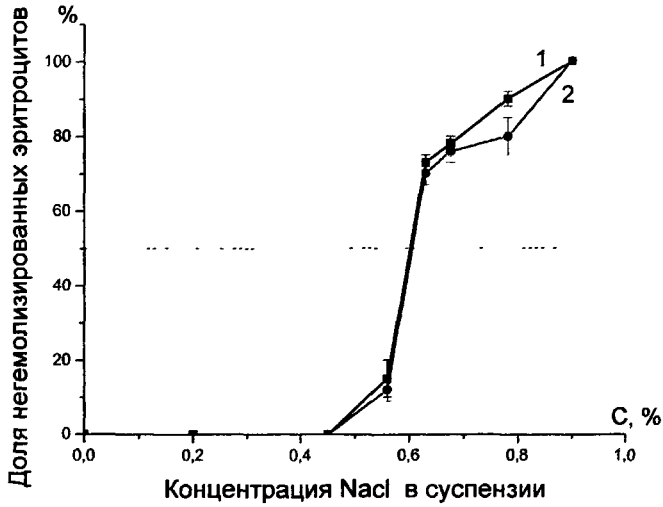


Рис. 4 Зависимость доли негемолизированных эритроцитов от концентрации соли NaCl (метод осмотической резистентности) через сутки после воздействия γ-излучения в дозе 5 сГр (2) и в контрольной суспензии без облучения (1)

Опытные данные показали, что статистически значимых различий в кинетике гемолиза эритроцитов в использованных суспензиях не наблюдалось. Однако, если аналогичные суспензии подвергали воздействию калиброванного импульсного электрического поля, то кинетические кривые уменьшения числа эритроцитов в облученной и необлученной суспензиях различались (рис. 5).

На промежутке времени t_2-t_1 наблюдается неаддитивность скоростей, а именно константа скорости уменьшения числа эритроцитов после комбинированного воздействия $\beta_{\gamma+E}$ больше, чем сумма констант скоростей после воздействия γ-излучения β_γ и импульсного электрического поля по отдельности β_E:

$$\beta_{\gamma+E} > \beta_\gamma + \beta_E .$$

На рис. 6 представлена зависимость $\beta_{\gamma+E}/(\beta_\gamma + \beta_E)$ от поглощенной дозы γ-излучения.

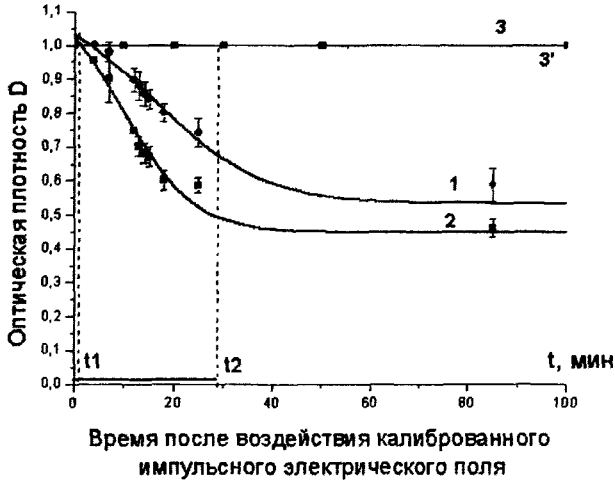


Рис 5. Кинетические кривые гемолиза Кривая 1 - контрольная суспензия после воздействия калиброванного электрического импульса (без облучения), кривая 2 – воздействие γ-излучения ^{226}Ra-источника (доза 5 сГр) + воздействие калиброванного электрического импульса, кривая 3 –после воздействия γ-излучения в той же дозе, кривая 3' –контроль (без облучения и без электропорации)

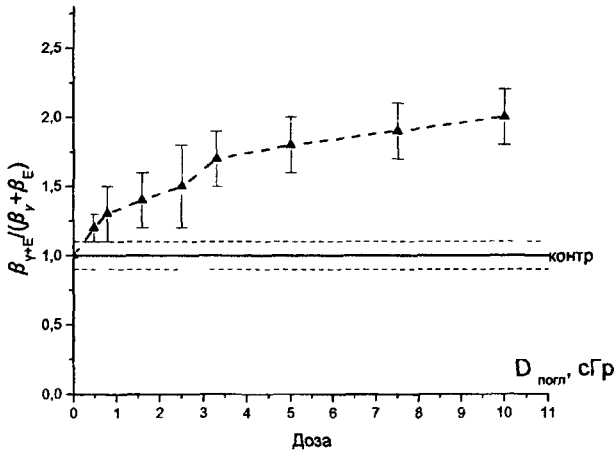


Рис 6. Зависимость нормированной константы скорости уменьшения числа эритроцитов $\beta_{\gamma+E}/(\beta_\gamma+\beta_E)$ от поглощенной дозы γ-излучения в результате комбинированного воздействия γ-излучения и импульсного электрического поля. Пунктиром указаны ошибки контроля

На рис. 7 представлены данные констант скоростей уменьшения числа эритроцитов после воздействия γ-излучения для трех различных доноров.

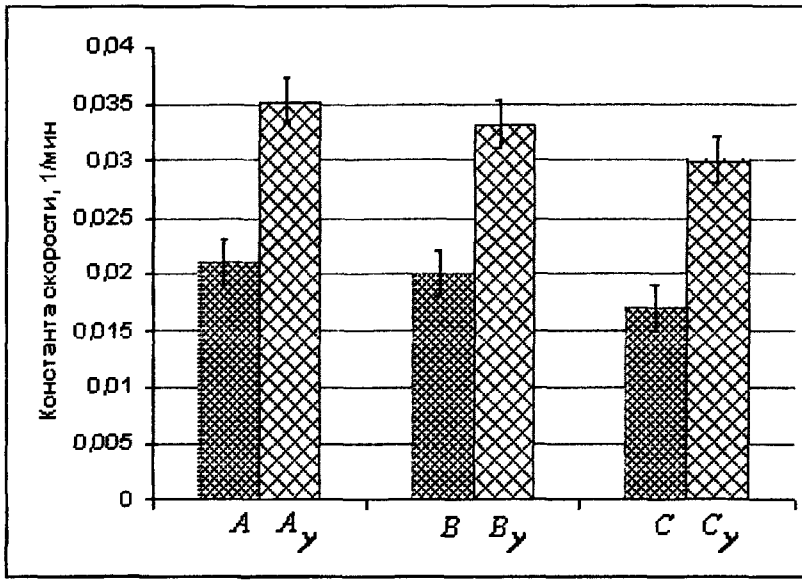


Рис. 7. Гистограмма значений констант скорости уменьшения числа эритроцитов β для доноров A,B,C Столбцы A,B,C – суспензия, подвергавшаяся воздействию импульса электрического поля, Aγ, Bγ,Cγ - столбцы – суспензия, предварительно подвергавшаяся воздействию γ-излучения в дозе 2,5 сГр, а затем калиброванного импульса электрического поля

Результаты приведённых опытов показали, что метод калиброванной электропорации позволяет выявлять скрытые повреждения, возникающие в мембранах эритроцитов после воздействия γ-излучения в дозе 1 – 10 сГр.

В **четвертой главе** приведены результаты экспериментальных исследований комбинированного действия пучка электронов и импульсного электрического поля. Схема опытов представлена на рис. 8.

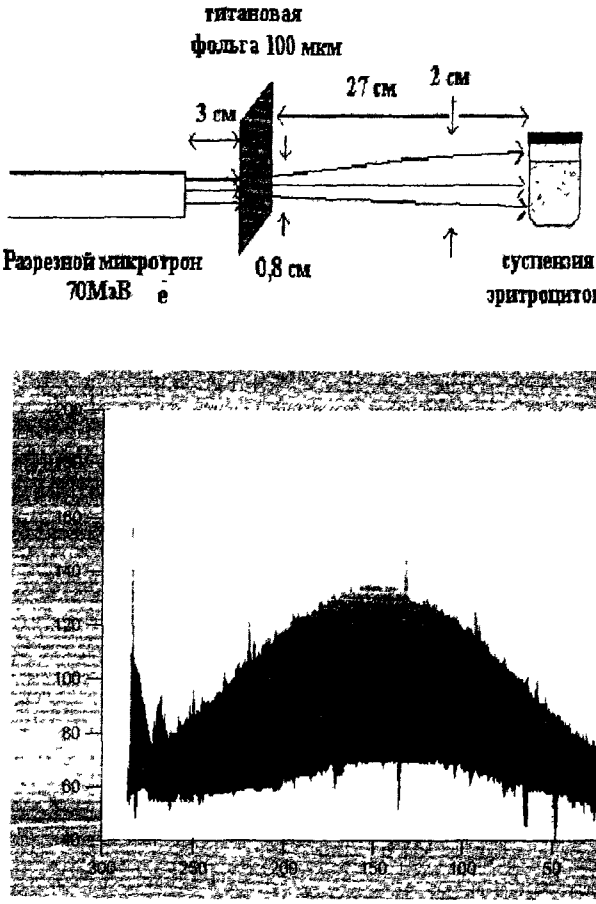


Рис. 8. Схема облучения суспензии эритроцитов пучком ускоренных электронов (а) и распределение дозы излучения в пучке (б); По оси y отложена доза облучения в отн. ед.; по оси x – расстояние от центра пучка (100 ед. =1,3 см)

Параметры пучка при энергии электронов 40 МэВ: ток в импульсе I=(0.7-1) мА, средний ток $I_{ср}$=(0,02-0,05) мкА, длительность импульса τ=4-5мкс, частота следования импульсов f=10 Гц. Время облучения 2 – 7 мин. Доза облучения составила от 2000 до 13400 Гр. Для отработки условий экспериментов была проведена проверка однородности облучения суспензии. Экспериментально с помощью воздействия пучка электронов на стекло и

последующей фотометрии было показано что неоднородность облучения в пробирке не превышает 8 10% (рис 8б)

Пробирку с суспензией облучали несколько минут пучком электронов, а затем через 1-3 мин часть облученной суспензии подвергали воздействию импульса дефибриллятора Оставшуюся часть облученной суспензии переливали в измерительную кювету и одновременно с опытной пробой регистрировали ее параметры в течение нескольких дней

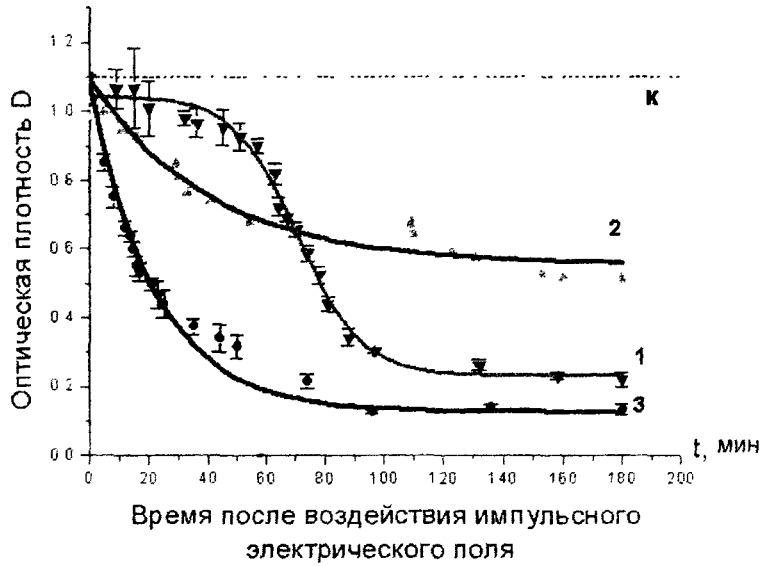


Рис 9 Кинетические кривые гемолиза эритроцитов в суспензии в результате воздействия пучка ускоренных электронов (1) , калиброванного импульсного электрического поля (2) и их комбинированного действия (3) Доза 7700 Гр (энергия электронов E=40 МэВ, средний ток пучка I= 1 мА, время облучения 4 мин)

Из данных, представленных на рис 9, следует эффект неаддитивности скоростей гемолиза В первые 40 мин после воздействия константа скорости уменьшения числа эритроцитов после комбинированного воздействия $\beta_{e,F}$ больше, чем сумма констант скоростей после воздействия пучка электронов β_e и импульсного электрического поля по отдельности β

$$\beta_{e,F} > \beta_e + \beta_F$$

Импульсное электрическое поле позволяет проявить скрытые эффекты повреждения мембран после облучения. На рис. 10 и 11 представлены опытные данные кинетики уменьшения числа эритроцитов после воздействия пучка электронов. Из рис. 10 следует, что в первые 20 мин после облучения статистически значимого различия между кинетикой гемолиза облученной и необлученной суспензий не наблюдалось. Различия между облученной и необлученной суспензиями проявились только через 20-30 мин. Однако для суспензий, облученных в дозах 2100 Гр, 5390 Гр и 9380 Гр, не наблюдалось статистически значимого различия и через 80 мин после облучения (рис. 11а).

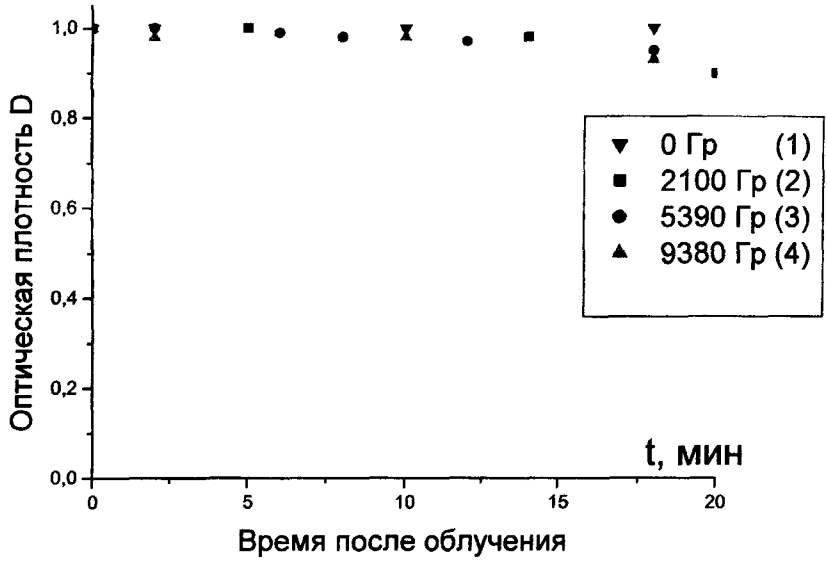


Рис. 10. Зависимость оптической плотности суспензии эритроцитов D от времени в промежутке времени от 0 до 20 мин после воздействия пучка электронов в дозах 2100, 5390 и 9380 Гр

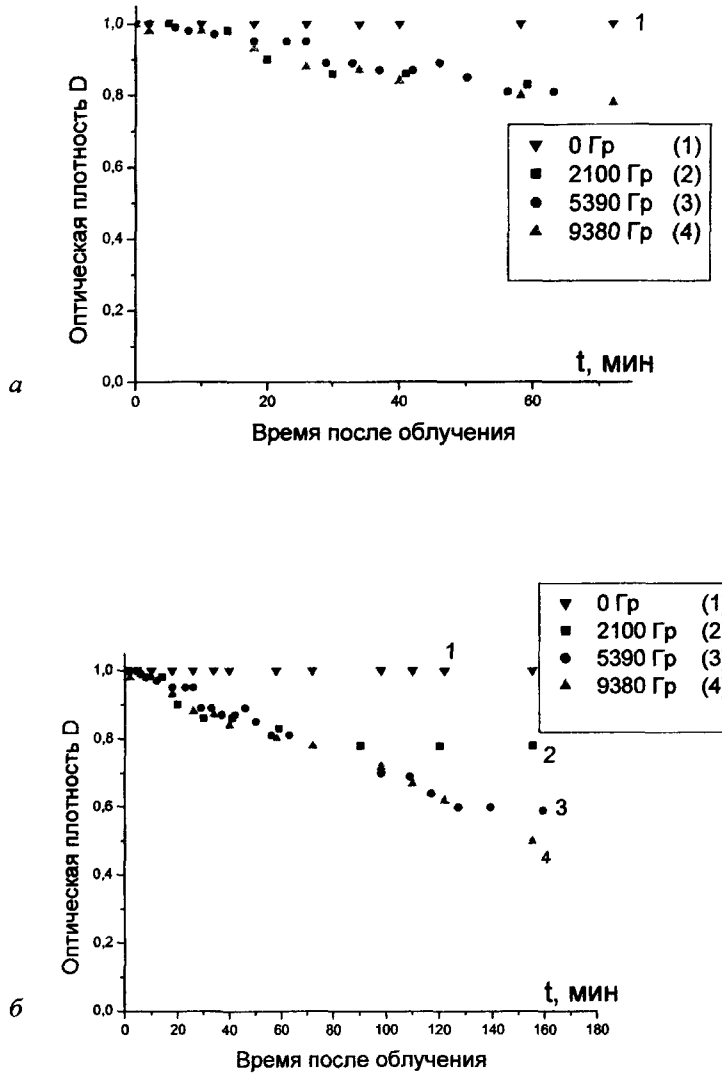


Рис. 11. Зависимость оптической плотности суспензии эритроцитов от времени после воздействия пучка электронов с энергией 40 МэВ в разных дозах: 0 Гр (1), 2100 Гр (2), 5390 Гр (3) и 9380 Гр (4) Время наблюдения 70 мин (а), 180 мин (б)

Метод комбинированного действия излучений и калиброванного импульсного электрического поля показал различие в эффектах, вызываемых действием пучка электронов в разных дозах через 1 мин после облучения (рис. 12).

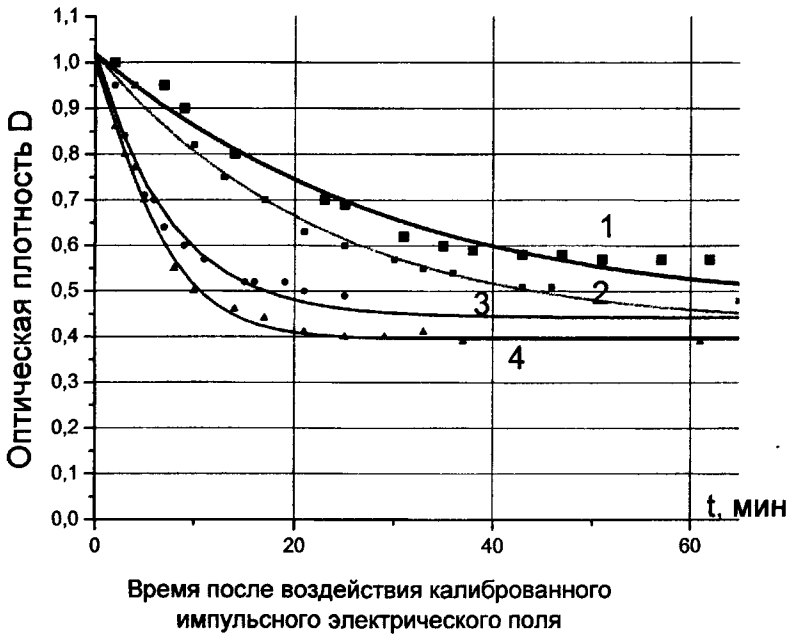


Рис. 12. Кинетические кривые гемолиза при комбинированном воздействии пучка электронов в разных дозах и калиброванного импульсного электрического поля. 1- 0 Гр, 2 - 2100 Гр, 3 - 5390 Гр, 4 – 9380 Гр

В результате воздействия пучка электронов в дозе 7700 Гр наблюдалось уменьшение порога электропорации мембраны на 11-13 % (рис. 13).

На рис. 14 представлена зависимость коэффициента неаддитивности

$$K = \frac{\beta_{e+E}}{\beta_e + \beta_E}$$

от поглощенной дозы.

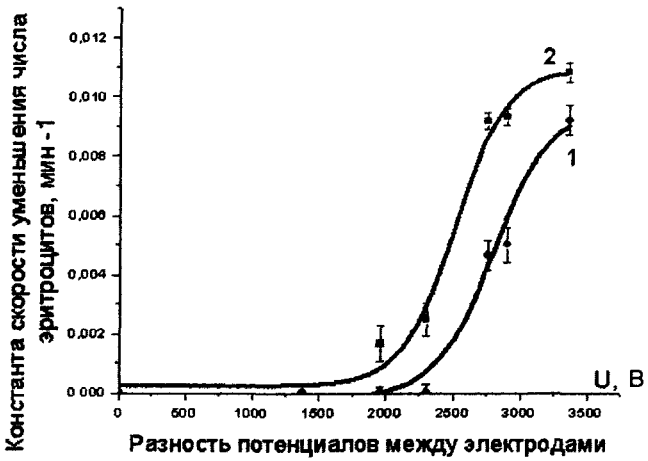


Рис. 13. Зависимость константы скорости уменьшения числа эритроцитов от разности потенциалов между электродами: 1- суспензия без облучения, 2 – суспензия после воздействия пучка электронов в дозе 7700 Гр

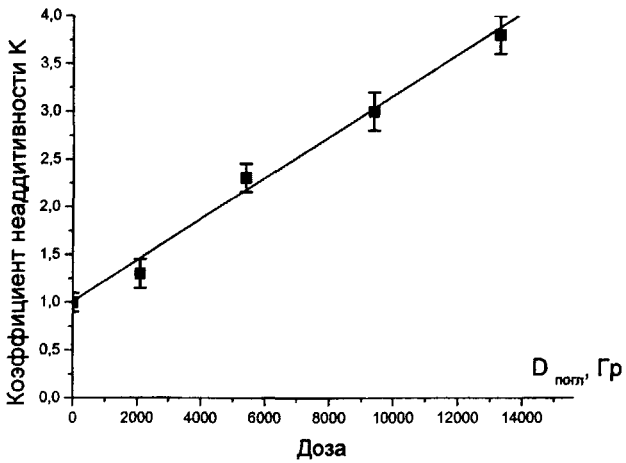


Рис 14. Зависимость коэффициента неаддитивности от поглощенной дозы

Таким образом, последующая электропорация мембран позволила проявить эффект воздействия пучка электронов (сдвиг пробойного напряжения), оценить степень этого воздействия и обнаружить скрытые повреждения мембран уже через несколько минут после воздействия.

В **пятой главе** представлен анализ механизма и математическое описание явлений, наблюдающихся при комбинированном воздействии γ-излучения, пучка электронов и импульсного электрического поля на биологические мембраны. В экспериментах, описанных в главах 3 и 4, показан эффект неаддитивности скоростей при комбинированном действии ионизирующего излучения (γ-излучение, пучок электронов) и импульсного электрического поля. Этот факт положен в основу теоретического анализа возможности применения импульсного электрического поля для диагностики скрытых повреждений биологических мембран.

При действии излучений на границе «раствор – мембрана» возникают активные центры электрохимических процессов. Для анализа результатов необходимо принять во внимание механизмы ионизации и возбуждения молекул в результате действия γ-излучения или пучка электронов на биологическую мембрану, и, как следствие этого, – перекисное окисление липидов, механизм осмотического гемолиза эритроцитов и механизм электропорации клеточных мембран.

В результате воздействия ионизирующего излучения изменяются собственные характеристики биологических мембран, определяющие ее электрический пробой. При облучении вещества возникают возбужденные и ионизированные молекулы. Цепные процессы окисления липидов приводят к образованию гидроперекисей ROOH. Процессы перекисного окисления липидов изменяют локальные диэлектрические свойства мембраны, которая рассматривается как биологический диэлектрик. Для электрического пробоя диэлектрика необходимо, чтобы напряженность поля превысила его электрическую прочность (электрической прочности соответствует пробивное напряжение).

В результате воздействия импульсного электрического поля в мембране образуются поры, то есть происходит электропорация. Количество пор и их радиус определяются наведенным трансмембранным потенциалом φ и пороговым потенциалом электрического пробоя $\varphi_{пор}$.

Наведенный трансмембранный потенциал φ зависит от напряженности электрического поля в растворе E и радиуса клетки r

$$\varphi = 1.5Er\cos\theta, \qquad (1)$$

где θ – угол между вектором E и радиус-вектором точки наблюдения на сфере.

Выделим поверхность мембраны единичной площади. Разобьем эту площадь на N одинаковых областей. В каждой области может образоваться пора. N велико. Образование поры в каждой такой области зависит от собственных свойств этой области. Реальная биологическая мембрана

эритроцита уже изначально неоднородна по своим электрохимическим свойства. Белки, разные сорта липидов, границы межмолекулярных разделов, ионные каналы, аквапоры, асимметрия липидов на внутренних и внешних сторонах клетки, различная толщина мембраны являются причиной этих неоднородностей. Поэтому надо учесть, что в различных участках мембраны потенциалы электрического пробоя могут быть разными (рис. 15). Собственные свойства определяют два параметра электропорации: пороговый потенциал электрического пробоя и радиус поры.

Набор элементарных макроскопических областей мембраны N можно рассматривать в виде статистического ансамбля. Выделим в фазовом пространстве состояний объем $d\varphi_{пор}$ около точки $\varphi_{пор}$ В данный момент времени в этом объеме заключены точки, характеризующие состояния dN систем ансамбля из их полного числа N. Тогда предел отношения: $\lim_{N\to\infty}(dN/N) = f_N(\varphi_{пор}, t)d\varphi_{пор}$ определяет плотность распределения (функцию статистического распределения) микроскопических состояний систем ансамбля в момент t.

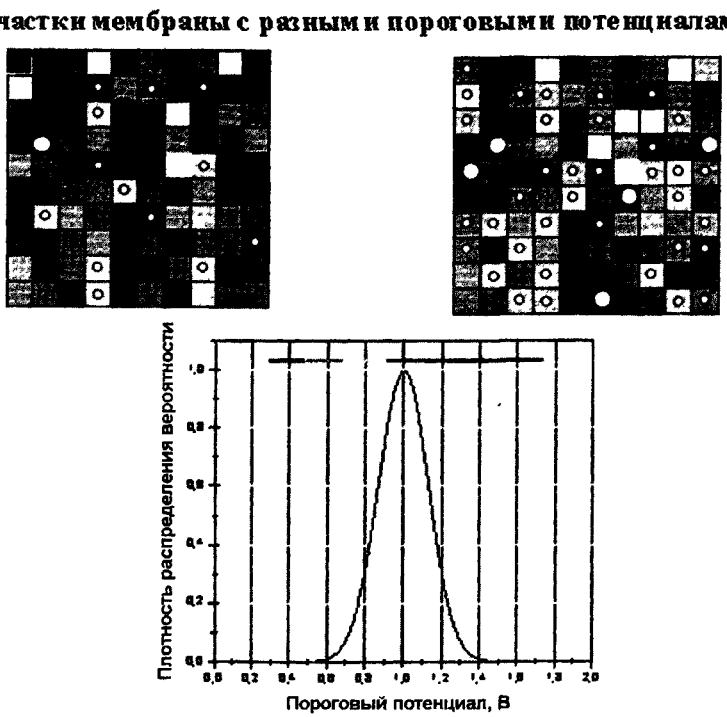


Рис. 15. Биологическая мембрана представлена в виде статистического ансамбля участков с различными локальными пороговыми потенциалами электрического пробоя (слева – исходная мембрана, справа – после воздействия излучения)

При условии, что $\varphi_{пор}$ подчиняется нормальному закону распределения, для плотности распределения:

$$f_N(\varphi_{пор}) = 1/(\sigma\sqrt{2\pi})\, exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\,ср})^2/2\sigma^2),$$

где $\varphi_{пор\,ср}$ – среднее по ансамблю областей N значение порогового потенциала, σ - среднее квадратическое отклонение. Пороговый потенциал в каждом участке мембраны определяется ее состоянием и ее микропараметрами.

При наведенном трансмембранном потенциале φ поры будут образовываться в тех областях, где $\varphi_{пор} < \varphi$. Доля участков dN/N с пороговым напряжением от $\varphi_{пор} - d\varphi_{пор}$ до $\varphi_{пор}$:

$$dN/N = 1/(\sigma\sqrt{2\pi})\, exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\,ср})^2/2\sigma^2)\, d\varphi_{пор}.$$

В таком случае количество пор, способных образоваться при этих условиях:

$$dN = N/(\sigma\sqrt{2\pi})\, exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\,ср})^2/2\sigma^2)\, d\varphi_{пор}.$$

Для вычисления площади всех образованных пор необходимо знать их радиусы. Радиус поры можно записать как: $r = k / \varphi_{пор}$.

Тогда площадь всех пор, образованных на одном квадратном метре поверхности:

$$S = N/(\sigma\sqrt{2\pi}) \int_{\varphi_{min}}^{\varphi} \exp(-(\varphi_{пор} - \varphi_{пор\,ср})^2 / 2\sigma^2)\pi(k/\varphi_{пор})^2 d\varphi_{пор}\,.$$

Величина φ_{min} – минимальный наведенный потенциал, при котором образуется 1 пора в мембране эритроцита.

Воздействие излучений изменяет параметры статистического распределения. В работе рассмотрены два предельных случая: облучение в малых и больших дозах.

Сечение полного поглощения γ-квантов атомами вещества складывается из сечений фотоэффекта $\sigma_ф$, комптоновского рассеяния $\sigma_к$, образования электронно-позитронных пар $\sigma_п$ и фотоядерных реакций $\sigma_{фя}$. При этом сечение фотоэффекта при малых энергиях γ –квантов $h\nu \ll m_e c^2$ описывается выражением (Черняев, 2004):

$$\sigma_{ф} = 1{,}25 \cdot 1{,}09 \cdot 10^{-16} Z^5 \left(\frac{13{,}61}{h\nu}\right)^{7/2}, \qquad (2)$$

$h\nu$ – в эВ, сечение в $см^2$.

Полное сечение комптоновского рассеяния описывается аналитическим выражением (Мухин, 1974):

$$\sigma_к = 2\pi r_e^2 \left\{ \frac{1+\varepsilon}{\varepsilon^2} \left[\frac{2(1+\varepsilon)}{1+2\varepsilon} - \frac{1}{\varepsilon} \ln(1+2\varepsilon) \right] + \frac{1}{2\varepsilon} \ln(1+2\varepsilon) - \frac{1+3\varepsilon}{(1+2\varepsilon)^2} \right\}, \quad (3)$$

здесь $\varepsilon = h\nu / m_e c^2$, $r_e = e^2 / m_e c^2$ - классический радиус электрона.

В таблице 1 для сравнения приведены значения для сечения фотоэффекта и комптоновского рассеяния для атомов кислорода (вода) и железа (гемоглобин) для энергий γ-квантов 0,6 и 0,3 МэВ.

Из расчетных данных, представленных в таблице 1, следует, что основную роль в уменьшении интенсивности γ-квантов в воде играет комптоновское рассеяние (для энергий фотонов выше 30-40 кэВ). Сечение фотоэффекта для железа соизмеримо или превышает сечение комптоновского рассеяния при более высоких энергиях γ–квантов 0,3 МэВ и менее. Однако в молекуле гемоглобина на 4 атома железа приходится около 10000 атомов с меньшим порядковым номером (*C, H, O, N*). Кроме того, эритроциты находятся в физиологическом растворе. В результате вклад фотоэффекта для атомов железа в ослабление потока γ-квантов близок к нулю для энергий фотонов более 30 – 40 кэВ.

Таблица 1. Сечения фотоэффекта и комптоновского рассеяния (в единицах $6{,}65 \cdot 10^{-25}$ см^2) для атомов кислорода и железа в случае энергий γ–квантов 0,3 и 0,6 МэВ

	Фотоэффект	Комптоновское рассеяние
Кислород		
E_γ =0,3 МэВ	0,0003	0,5
E_γ =0,6 МэВ	0,00003	0,4
Железо		
E_γ = 0,3 Мэв	0,1	0,5
E_γ = 0,6 МэВ	0,01	0,4

Рождение электрон-позитронных пар – пороговый эффект. Пороговая энергия образования ($e^- e^{+}$) пар в поле атома или ядра составляет 1,02 МэВ, а в поле электрона 2,04 МэВ. В наших опытах по воздействию гамма-излучения энергия квантов меньше.

Таким образом, для энергии γ-кванта около 0,2 -1 МэВ основную роль играет комптоновское рассеяние, в результате которого в суспензии образуются потоки вторичных γ–квантов и вторичных электронов. Основной вклад в повреждение мембран эритроцитов будут вносить именно потоки вторичных электронов (рис. 16). Вторичные электроны, сталкиваясь с атомами, ионизируют и возбуждают молекулы и атомы суспензии на

протяжении всего трека, постепенно теряя при этом свою энергию. Таким образом, энергия электрона уменьшается за счет ионизационных потерь. В комптон-эффекте энергия рассеянного γ-кванта E_{γ} и электрона отдачи E_e в зависимости от угла рассеяния имеют вид:

$$E_{\gamma'} = \frac{E_\gamma}{1+E_\gamma(1-\cos\theta)/mc^2}, \quad E_e = \frac{E_\gamma}{1+mc^2/E_\gamma(1-\cos\theta)},$$

где θ – угол вылета рассеянного γ-кванта. Суммарное количество треков, пересекающих каждый эритроцит, определяет степень поражения его мембраны. Чем больше треков пересекает эритроцит, тем больше вероятность повреждения мембраны. Введем понятие характерной длины трека: $l = \frac{E_e}{dE_e/dx}$, где dE/dx – ионизационные потери на единицу длины, Ee – энергия образовавшегося вторичного электрона. Величина ионизационных потерь зависит от энергии электрона, которая в свою очередь зависит от угла θ: $dE_e/dx(E_e(\theta))$.

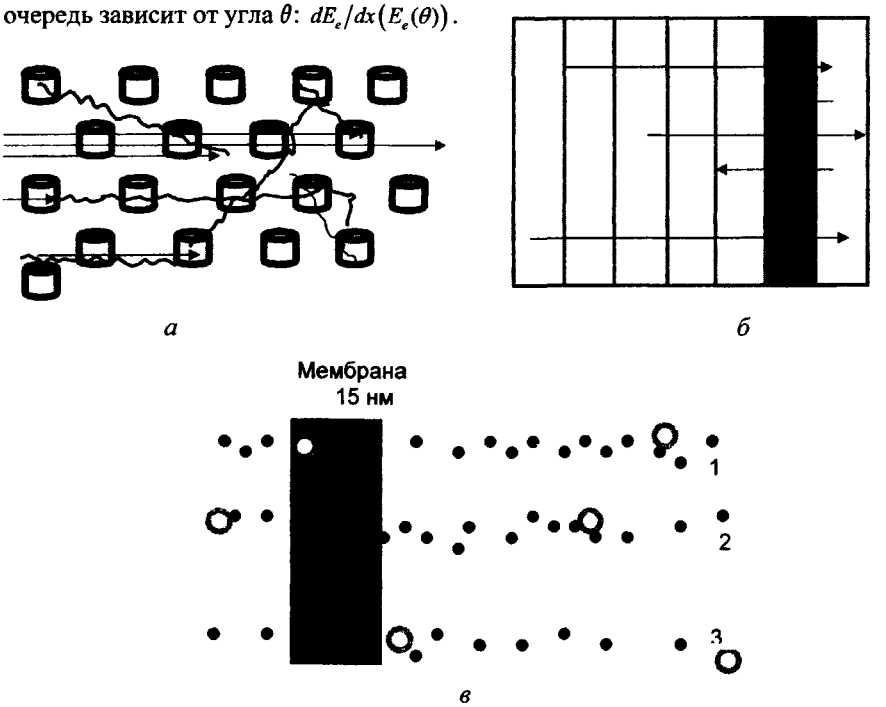


Рис. 16. Схематичное изображение пересечения мембран треками электронов. а) Постановка физической задачи прохождения γ-квантов через суспензию эритроцитов, б) треки вторичных электронов, возникших в различных участках, могут пересечь мембрану, в) в области трека возникает ионизация и возбуждение молекул

Дифференциальное сечение комптоновского рассеяния описывается формулой Клейна–Нишины–Тамма:

$$\frac{d\sigma_{комп}}{d\Omega} = \frac{r}{2}\left(\frac{E_{\gamma'}}{E_\gamma}\right)^2\left(\frac{E_\gamma}{E_{\gamma'}} + \frac{E_{\gamma'}}{E_\gamma} - \sin^2\theta\right).$$

Используя формулы для дифференциального сечения комптоновского рассеяния и зависимости ионизационных потерь от энергии вторичного электрона и угла θ, можно оценить среднюю длину трека вторичного электрона:

$$L = \frac{\int_0^{2\pi} \frac{d\sigma_{комп}}{d\Omega}(\theta)\frac{E_e(\theta)}{dE_e(\theta)/dx}d\theta}{\int_0^{2\pi} \frac{d\sigma_{комп}}{d\Omega}(\theta)d\theta}.$$

Оценки показывают, что эта величина для энергии исходных γ-квантов с энергий 1 МэВ составляет $L \approx 500$ мкм.

В областях, охватываемых треком, будет происходить ионизация и возбуждение частиц. Оценим, сколько слоев, равных толщине мембраны будут охвачены 1 треком со средней длиной L: $N' = L/l_м$ Здесь рассматриваем эффективную толщину мембраны с учетом нескольких молекулярных слоев воды, радиолитические процессы в которых также могут привести к повреждению мембраны , $l_м \approx 15$ нм.

Плотность потока γ-квантов в суспензии уменьшается по закону:

$I=I_o*exp(-\mu x)$.

Оценим коэффициент ослабления $\mu = nZ\sigma = \rho N_A \frac{Z}{A}\sigma(\varepsilon)$. Для энергии γ-кванта 1 МэВ $\epsilon=2$. Полное сечение комптоновского рассеяния описывается аналитическим выражением (3). Тогда $\mu \approx 5$ м$^{-1}$. В результате на толщине мембраны плотность потока γ-квантов уменьшится на

$dI = -\mu I l_м \cdot L / l_м = -\mu I L,$

Через мишень, равную половине площади мембраны эритроцита, $S_м$, будет проходить за 1 с количество треков $N_{тр} = \mu I L S_м$. Это означает, что за время, равное $\tau = \frac{1}{N_{тр}}$ в среднем каждый эритроцит в суспензии будет затронут треком.

Электроны с энергией 0,5 МэВ имеют величину ЛПЭ около 0,2 кэВ/мкм. Такие электроны образуют около 6 пар ионов на 1 мкм пути. То есть характерное расстояние между ними 150 нм, что в примерно в 10 раз больше эффективной толщины мембраны. Поэтому вероятность ионизации молекул в мембране около 0,1. Вероятность того, что хотя бы 1 акт ионизации придется

на мембрану, будет почти равна 1, если число треков, ее пересекающих, больше 10. Это и будем считать критерием появления активного центра повреждения в мембране.

Данный критерий будет выполнен, если время облучения составляет

$$t_{мин\ ион} \approx 10\frac{1}{N_{тр}}\ (\text{с}).$$

Оценим количественно значение минимальной дозы для зарождения активных центров повреждения в мишени – мембране эритроцита. Для $S_м = 10^{-10}$ м^2, $\mu = 5$ м$^{-1}$, $I = 10^7$ квант/(см^{2}с), $L = 500$ мкм минимальное время облучения составляет около 5 мин. Таким образом, при мощности дозы источника гамма-излучения 5 сГр/ час минимальная доза, при которой в мембране зарождаются активные центры повреждения составляет около 0,5 сГр. Эти данные хорошо согласуются с опытными фактами, представленными в главе 2. Наряду с ионизацией возникают возбужденные молекулы на расстоянии около 5 нм. Это увеличивает число активных центров в мембране.

В этих активных центрах порог электропорации $\varphi_{пор}$. будет снижен. То есть поврежденные участки мембраны эритроцита можно рассматривать как новый статистический ансамбль, у которого будут другими средний пороговый потенциал и среднее квадратическое отклонение. И, следовательно, в мембране после облучения существуют два статистических ансамбля. На рис. 17 приведены зависимости $fN\pi r^2$ для двух ансамблей.

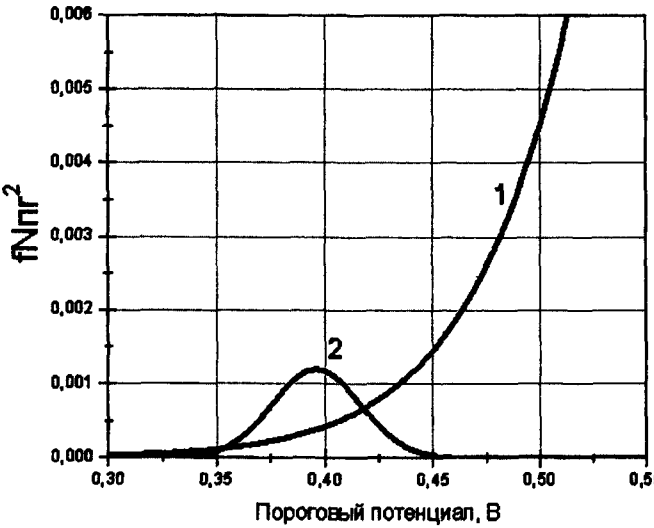


Рис. 17. Два статистических ансамбля : 1 – неповрежденная элементы, 2 – ансамбль активных центров в результате воздействия γ-излучения

Считая скорость гемолиза пропорциональной площади повреждения, $V_\gamma/V_к = (S_\gamma+S)/S$,
можно оценить, что скорость уменьшения числа эритроцитов после электропорации возрастает в 1,2 – 2 раза для облученной суспензии по сравнению с необлученной. Это хорошо согласуется с экспериментальными данными.

Оценим число активных центров повреждения при облучении эритроцитов пучком ускоренных электронов. Для тока I= 1 мА и времени облучения t= 4 мин на каждый эритроцит придется воздействие примерно от 10^6 первичных электронов. В этом случае можно говорить об уменьшении среднего порогового потенциала мембраны (рис. 18).

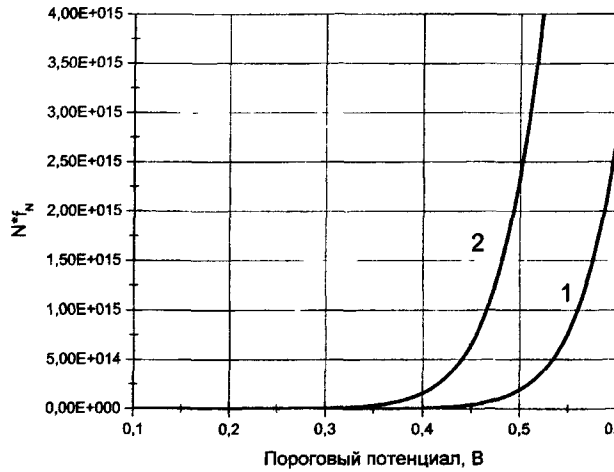
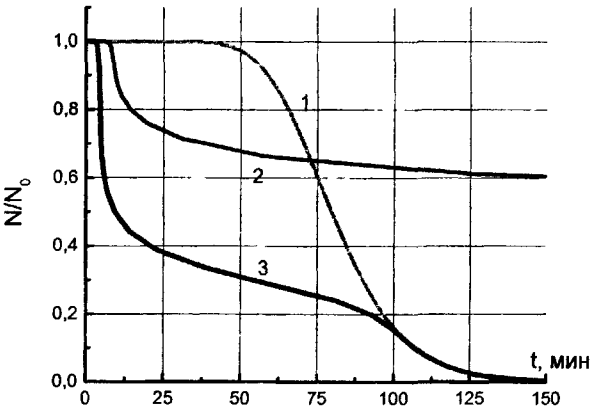


Рис. 18. Изменение среднего порогового потенциала на 10% после воздействия пучка электронов (кривая 2) и исходный ансамбль (кривая 1)

В рамках предложенной модели рассчитаны теоретические кинетические кривые уменьшения числа эритроцитов после воздействия пучка электронов и импульсного электрического поля. Сложность анализа экспериментальных кинетических кривых заключается в том, что измеряется интегральный эффект изменения количества клеток популяции. При этом при теоретическом описании необходимо учитывать как характеристики и процессы, происходящие в каждом эритроците в результате воздействия ионизирующего излучения, так и статистический вес эритроцита с данным диаметром в популяции. Изначально диаметр эритроцитов распределен по нормальному закону.

На рис. (рис. 19) для сравнения приведены расчетные кинетические кривые гемолиза (а) и экспериментальные (б).

а



б

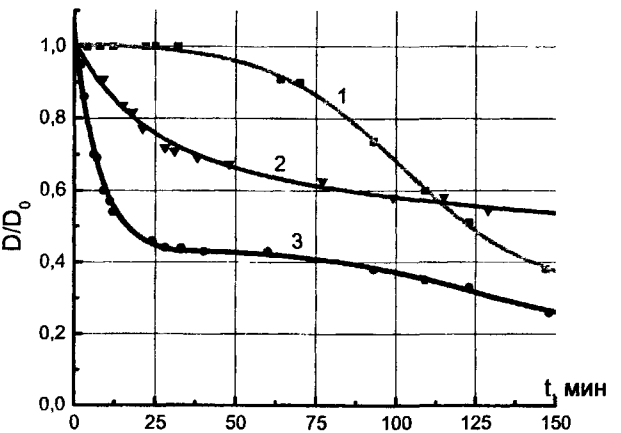


Рис 19 Кинетические кривые гемолиза в результате комбинированного воздействия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля 1 – кривая гибели эритроцитов в результате облучения электронами, 2 - кривая гибели эритроцитов в результате воздействия импульсного электрического поля, 3 – кривая гибели эритроцитов в результате комбинированного воздействия а) Теоретические кинетические кривые, б) экспериментальные кинетические кривые (время воздействия 4 мин, ток пучка I=0,8мА, T= 20 ^{0}C)

ЕКА

Теоретические кинетические кривые гемолиза, рассчитанные в рамках предложенной модели, хорошо согласуются с экспериментальными кривыми, представленными в главе 4.

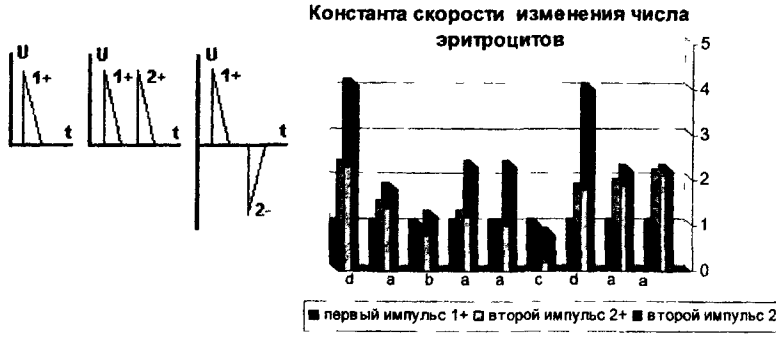
Таким образом, пучок ускоренных электронов, а также вторичные электроны комптоновского рассеяния гамма-излучения порождают в локальных участках мембран скрытые повреждения, которые и уменьшают в этих участках пороговый потенциал электрического пробоя. В результате возрастает число активных центров электропорации, что приводит к изменению констант скоростей гемолиза.

В **главе 6** приведены результаты экспериментов по апробации предложенного метода для исследования воздействия на мембраны физико-химических факторов различной природы: ультрафиолетового излучения, импульсов различной полярности, фармакологических препаратов, возрастных изменений у людей.

Экспериментально показано, что кинетика гемолиза в результате комбинированного воздействия ультрафиолетового излучения с длиной волны 254 нм и импульсного электрического поля на мембраны эритроцитов аналогична кинетике гемолиза при комбинированном воздействии γ-излучения.

Проведено исследование воздействия двух последовательных импульсов на мембраны клеток. Второй импульс можно рассматривать в качестве «диагностического» для возникших последствий от первого импульса. Эта проблема имеет и непосредственно практическое значение, связанное с необходимостью оценки состояния клеток и ткани при дефибрилляции сердца моно- и биполярным электрическим импульсом. На рис. 20а схематично представлена последовательность двух импульсов, действующих на суспензию эритроцитов. На рис. 20б представлены результаты опытов по воздействию первого и второго электрического импульса на суспензию эритроцитов. В каждой серии опытов столбец слева показывает константу скорости уменьшения числа эритроцитов в результате воздействия импульса 1+. Эта скорость принята за единицу. Показано, что константа скорости уменьшения клеток в результате воздействия второго импульса выше, чем первого, причем, в результате воздействия импульса 2- выше, чем 2+. Количественный анализ наблюдаемых опытных данных проведен с помощью вышеописанной модели. Показано, что порог электрического пробоя в результате воздействия первого импульса снижается на 7 ± 5 %.

Эксперименты по исследованию особенностей воздействия перфторана на биологические мембраны проводились совместно с сотрудниками НИИ общей реаниматологии РАМН РФ. Показано, что действие перфторана на биологические мембраны различалось в зависимости от его концентрации. При воздействии двумя импульсами (рис. 21) это различие проявлялось в большей степени, чем при одиночном импульсе.



а *б*

Рис 20. Действие двух импульсов электрического поля на суспензию эритроцитов. а) Схематичное представление одиночного импульса (1+), двух импульсов одной полярности (1+, 2+) и двух импульсов разной полярности (1+, 2-). Цифрой 1 обозначен первый импульс, цифрой 2 – второй импульс б) Результаты экспериментов Приведена выборка констант скоростей уменьшения числа эритроцитов в результате воздействия импульса 1+ (столбец слева), импульса 2+ (столбец в середине), импульса 2- (столбец справа) За единицу принята константа скорости уменьшения числа эритроцитов в результате воздействия импульса 1

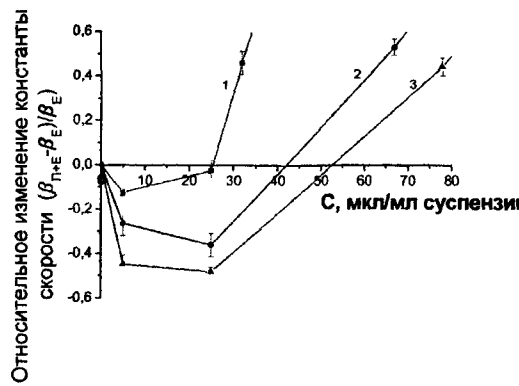


Рис. 21. Зависимость относительного изменения константы скорости уменьшения числа эритроцитов $(\beta_{1+A}-\beta_A)/\beta_E$ от концентрации перфторана в суспензии для импульса 1+ (кривая 1), для импульсов 1+, 2+ (кривая 2) и для импульсов 1+,2- (кривая 3) Здесь β_{1+F}-скорость уменьшения числа эритроцитов в результате добавления перфторана в суспензию и электропорации, β_E- после электропорации

Использование калиброванной электропорации дало возможность показать изменения состояния мембран эритроцитов для доноров различных возрастных групп (рис. 22).

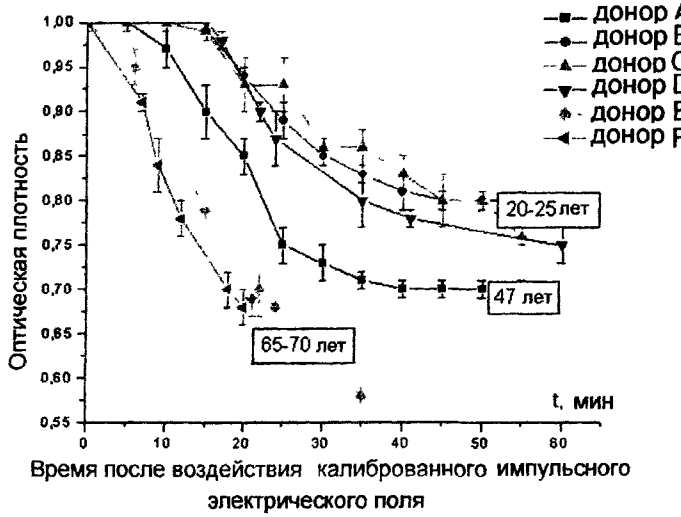


Рис 22 Кинетические кривые уменьшения числа эритроцитов после воздействия импульса электрического поля для суспензий эритроцитов 6 доноров (женщины)

Таким образом, предложенный метод последующей калиброванной электропорации может быть применён для исследований воздействий широкого спектра физико-химических факторов на мембраны биологических клеток.

В **приложении 1** приведены особенности процессов, которые необходимо рассматривать при анализе комбинированного действия γ-излучения, пучка электронов и импульсного электрического поля на биологические мембраны: механизмы радиолиза, электропорации биологических мембран, коллоидно-осмотического гемолиза.

В **приложении 2** приведена математическая модель действия ионизирующего излучения и импульсного электрического поля на ультраструктуру капиллярной стенки (базальная мембрана), приводящие к нарушениям синергизма диффузионных и фильтрационно-реабсорбционных процессов в системе «кровь-ткань».

Выводы

1. Предложен метод детектирования γ-излучения и пучка электронов в широком диапазоне доз, на основе калиброванной необратимой электропорации биологических мембран.

2. При комбинированном действии γ-излучения и импульсного электрического поля на биологические мембраны наблюдается неаддитивность констант скоростей уменьшения числа эритроцитов в суспензии. Константа скорости гемолиза клеток при комбинированном воздействии больше, чем сумма констант скоростей при воздействии каждого из этих факторов по отдельности, в 1,2 – 1,8 раза при поглощенной дозе ионизирующего излучения 0,5 – 10 сГр с мощностью дозы 5 сГр/час.

3. При комбинированном воздействии пучка электронов и калиброванного импульсного электрического поля обнаружена неаддитивность констант скоростей гемолиза в первые 5 – 30 минут после облучения. Константа скорости при комбинированном воздействии была больше, чем сумма констант скоростей при воздействии этих же факторов по отдельности, в 1,2 – 8 раз при облучении в дозе 2000 – 13400 Гр (ток пучка 0,7 – 1 мА, энергия электрона 40 МэВ, частота следования импульсов 10 Гц).

4. Кинетические кривые гемолиза эритроцитов в облученной (γ-излучение в малых дозах до 10 сГр) и необлученной суспензиях статистически не различаются. Показана возможность выявления скрытых повреждений мембран после воздействия γ-излучения в малых дозах (0,5 10 сГр) с помощью калиброванной необратимой электропорации.

5. В первые 20 мин после облучения пучком электронов в дозах 0, 2100 , 5390 , 9380 Гр не наблюдается статистически значимого различия. Различие в кинетике гемолиза между необлученной и облученными суспензиями проявлялось через 20-25 мин после облучения. Через 80 – 100 мин после облучения в дозе 2100 Гр наблюдается отличие эффекта от наблюдаемого при облучении в дозах 5390 Гр и 9380 Гр; через 140 – 150 мин наблюдается отличие эффектов после облучения в дозах 5390 и 9380 Гр. Калиброванная необратимая электропорация позволила выявить действие излучения в указанных дозах на биологические мембраны уже через 1-3 мин после воздействия пучка электронов.

6. Оптимальными параметрами калиброванного электрического импульса являются амплитуда 2900 В, длительность 10 мс, при этом расстояние между электродами 1,7 см, температура суспензии 20 ^{0}C.

7. Для энергий γ-квантов в диапазоне 0,1 -1 МэВ основную роль играет комптоновское рассеяние в суспензии эритроцитов в физиологическом

растворе. В результате этого в суспензии образуются потоки вторичных электронов, которые и вносят основной вклад в повреждение мембран.

8. Биологическую мембрану можно рассматривать в виде статистического ансамбля участков с различными электрическими свойствами. Установлено, что действие ионизирующего излучения изменяет параметры статистического распределения.

9. Предложенная модель позволяет аналитически связать исходные характеристики излучений с кинетическими кривыми гемолиза. При этом учитываются параметры пучка электронов, плотность потока γ-квантов, распределение эритроцитов по диаметру в исходной популяции.

10. Сформулирована и аналитически решена задача оценки минимальной дозы облучения γ-квантами для возникновения активных центров электропорации в мембране эритроцитов. Такая доза составляет (0,5 – 1) сГр.

11. В модельном эксперименте на бислойных липидных мембранах измерены флуктуации токов и оценены радиусы пор при различных температурах в области фазового перехода. При рабочей температуре ниже точки фазового перехода в мембранах могут возникать активные центры электрического пробоя.

12. Создана экспериментальная установка для исследования действия излучений на мембраны, включающая в себя разрезной микротрон импульсного действия (НИИЯФ МГУ), контейнеры для источников γ-излучения, прибор для электропорации биологических мембран, регистрирующий фотоколориметр, устройство для размещения модельных биологических объектов облучения.

13. При воздействии ультрафиолетового излучения с длиной волны 254 нм на мембраны эритроцитов происходит уменьшение порога электропорации на 10-15%.

14. Теоретически показано, что нарушение фильтрационно-реабсорбционного равновесия и фильтрационно-диффузионного синергизма в результате воздействия ионизирующего излучения на стенки микрососудов приводит к гипоксии тканей.

15. Использование метода исследования скрытых повреждений в биологических мембранах с помощью калиброванной электропорации дало возможность установить, что:

- действие перфторуглеродных соединений на клетки зависит от их концентрации; при концентрации 10 - 20 мкл/ мл константа скорости

гемолиза уменьшатся на 20 – 40%, а при концентрации 50 – 100 мкл/мл увеличивается в 2 - 6 раз.

- в результате действия двух последовательных электрических импульсов разной полярности константа скорости гемолиза эритроцитов в 1,2 -2 раза больше, чем для двух однополярных импульсов.
- константа скорости гемолиза для эритроцитов различных возрастных групп линейно зависит от возраста от 25 до 70 лет; коэффициент пропорциональности $0{,}0024 \pm 0{,}0002$ (мин$^{-1}$/лет).

Основное содержание диссертации опубликовано в следующих работах

1. Козлова Е.К., Портнягин А.И., Романченко А.Н. Возникновение упорядоченных образований при действии оптического излучения на гальванический процесс // Квантовая электроника. 1984. Т.II, №6. С. 1280 – 1281.

2. Еременко А.А., Козлова Е.К., Портнягин А.И., Романченко А.Н., Филиппов А.Е. Влияние оптического излучения на процесс химического никелирования // Квантовая электроника. 1985. Т.II, №8. С. 1677 – 1679.

3. Козлова Е.К., Портнягин А.И. Импульсное оптическое воздействие на приэлектродные процессы // Вестник Московского Университета. Сер. 3. Физика и астрономия. 1986. Т. 27. № 4.С. 102 – 104.

4. Козлова Е.К., Портнягин А.И., Филиппов А.Е. Термоградиентная модель влиния лазерного излучения на автокаталитические реакции // Известия АН СССР, сер. физ. 1986. Т.50, №6. С. 1235 – 1238.

5. Bunkin F.V., Luk'yanchuc B.S., Shafeev G.A., Kozlova E.K., Portnyagin A.I., Yeromenko A.A., Mogyoresy P., Kiss J.G. Si – etching affected by IR laser radiation // Appl. Phys. A37. 1986. P. 117 – 118.

6. Гусев В.Э., Козлова Е.К., Портнягин А.И. О роли термоградиентных явлений в лазерной электрохимии // Квантовая электроника. 1987. Т.14. №2. С. 101 – 106.

7. Kozlova E.K., Badikov V.I., Chernych A.M. Modeling blood flow in vessels with changeable caliber for physiology and biophysics courses // Am. J. Physiology. 1997. V.272 . P. S26 – S30.

8 Богушевич М.С., Востриков В.А., Козлова Е.К., Черныш А.М. Сегментарная сократительная активность левого желудочка при жизнеопасных аритмиях // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 1999, № 2. С. 283 – 290.

9. Козлова Е.К., Богушевич М.С., Черныш А.М. Фильтрационно-реабсорбционные процессы в капиллярах при нарушениях их ультраструктуры в терминальных состояниях // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2000. Приложение 2. С. 33 – 36.

10. Козлова Е.К., Черныш А.М., Иванов С.А., Кошелев В.Б., Маттейс Т.Н. Моделирование распределения кровотока при фильтрационно-реабсорбционных процессах в капиллярах // Биофизика. 2000. Т. 45, вып.3. С.552 – 555.

11. Kozlova E.K., Chernysh A.M., Matteys T.N. Modeling of blood flow as the result of filtration-reabsorbtion processes in capillaries //Am. J. Physiol., Advances in physiology education. 2000. V. 23. P. 32-39.

12. Козлова Е.К., Фомина У.А., Черняев А.П., Черныш А.М. Влияние пучка ускоренных электронов на кинетику гемолиза эритроцитов // Медицинская физика. 2002. №2. С. 47 - 53.

13. Мороз В.В., Богушевич М.С., Востриков В.А., Козлова Е.К., Черныш А.М. Влияние формы высоковольтного импульса на эффект дефибрилляции // Анестезиология и реаниматология. 2002. № 6. С. 60 – 63.

14. Антонов В.Ф., Черныш А.М., Пасечник В.И., Вознесенский С.А., Козлова Е.К. "Практикум по биофизике". М.: Владос. 2002. 352 с.

15. Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М., Шведунов В.И., Фомина У.А., Шаракшанэ А.С., Ермаков А.Н. Действие пучка ускоренных электронов на динамику электропорации биологических мембран // Медицинская физика. 2003. № 1. С. 50 – 56.

16. Антонов В.Ф., Черныш А.М., Пасечник В.И., Вознесенский С.А., Козлова Е.К. "Биофизика" (Учебник, издание второе, исправленное, дополненное). М.: Владос. 2003. 288 с.

17. Alexeeva P.J., E.K. Kozlova, U.A. Fomina. The behaviour of biological cell population under the action of ionizing radiation // Second international summer student school "Nuclear physics methods and accelerators in biology and medicine. Poznan, Poland. 2003. P. 29 – 33.

18. Козлова Е.К., Черняев А.П., Шведунов В.И., Черныш А.М., Фомина У.А., Шаракшанэ А.С. Особенности комбинированного действия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля на биологические клетки // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2004. № 5- 6. С. 65 – 74.

19. Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М., Близнюк У.А., Алексеева П.Ю. Модель кинетики гемолиза эритроцитов при действии пучка электронов и импульсного электрического поля // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. 2004. № 2. С. 19 – 22.

20. Козлова Е.К., Мороз В.В., Богушевич М.С., Алексеева П.Ю., Черныш А.М. Способ определения степени повреждений мембран эритроцитов // Решение о выдаче патента на изобретение. № 2004110391/15(011344). 2004.

21. В.В.Мороз, Черныш А.М., М.С.Богушевич, Е.К.Козлова, А.С.Шаракшанэ. Экспериментальное исследование действия дефибриллирующих импульсов разной формы на биологические мембраны // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2004. Т. 137, №2. С. 1401 – 44.

22. Козлова Е.К., Черняев А.П., Близнюк У.А., Черныш А.М. Нарушение тканевого обмена при повреждении ультраструктуры капилляра // Вестник Московского университета. 2004. №3. С. 11 – 14.

23. Козлова Е.К., Черняев А.П., Алексеева П.Ю., Черныш А.М. Влияние ионизирующего излучения на электропорацию мембран эритроцитов. Труды V межвузовской научной школы молодых специалистов «Концентрированные потоки энергии в космической технике, электронике, экологии и медицине», НИИЯФ МГУ. 2004. С. 105 – 109.

24. Е.К.Козлова, У.А.Фомина, В.В.Мороз, М.С.Богушевич, Черныш А.М. Пространственно-временные нарушения процессов обмена в системе кровь-ткань при терминальных состояниях организма // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2004. №1. С. 20 – 22.

25. Козлова Е.К, Черныш А.М., Мороз В.В., Богушевич М.С., Черняев А.П., Алексеева П.Ю. Комбинированное действие гамма-излучения, импульсного электрического поля и перфторана на мембраны эритроцитов // Медицинская физика. 2004. № 4. С. 49 – 54.

26. Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М., Алексеева П.Ю. Исследование воздействия гамма-излучения на эритроциты с помощью электропорации // Вестник Московского университета. Серия 3. Физика. Астрономия. 2005. № 3. С. 19 – 22.

27. Козлова Е.К., Черняев А.П., Близнюк У.А, Черныш А.М.,Алексеева П.Ю. Динамика изменения диэлектрических свойств мембран эритроцитов после воздействия на них малых доз гамма-излучения // Труды VI Межвузовской научной школы молодых специалистов «Концентрированные потоки энергии в космической технике, электронике, экологии и медицине». НИИЯФ МГУ. 2005. С. 118 – 123.

28. Козлова Е.К., Черняев А.П., Алексеева П.Ю., Близнюк У.А., Черныш А.М., Назарова М.А. Диагностика состояния биологических мембран после воздействия малых доз гамма-излучения // Радиационная биология. Радиоэкология. 2005. Т. 45, № 6. С. 653 – 657.

29. Мороз В.В., Козлова Е.К., Богушевич М.С., Алексеева П.Ю., Черныш А.М. Перфторан в суспензии крови. Эффекты закрепляющего и

разрушающего действия на модифицированные электрическими импульсами мембраны // Общая реаниматология. 2005. Т.1, № 3. С. 5 – 10.

30. Козлова Е.К., Мороз В.В., Богушевич М.С., Алексеева П.Ю., Черныш А.М. Влияние формы электрического импульса на электропорацию мембран эритроцитов // Общая реаниматология. 2005. Т.1. № 1. С. 42 – 46.

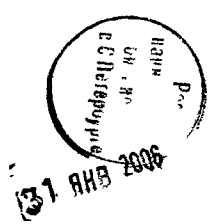
31. Козлова Е.К., Черняев А.П., Черныш А.М., Алексеева П.Ю. Электропорация – эффективный метод экспресс-диагностики повреждений биологических мембран в результате воздействия физико-химических факторов на эритроциты // Препринт НИИЯФ МГУ – 2005-7/ 773.

32. E.K.Kozlova, A.M. Chernysh, A.P. Chernyaev, V.V. Moroz, M.S. Bogushevich, P. Yu. Alekseeva . Membrane electroporation under the combined action of physicochemical factors on erythrocytes // European Association for Red Cell Research ,15th Meeting , Murten, Switzerland, April, 2005. P. 78.

33. Козлова Е.К., Черняев А.П., Алексеева П.Ю., Близнюк У.А., Черныш А.М. Диагностика скрытых повреждений биологических мембран с помощью электропорации. Ломоносовские чтения - 2005. Секция физика. М., Физический факультет МГУ. С. 61 – 64.

Подписано в печать =15.11.2005
Формат 60×88 1/16. Объем 2.0 п.л.
Тираж 100 экз. Заказ № 148
Отпечатано в ООО «Соцветие красок»
119992 г.Москва, Ленинские горы, д.1
Главное здание МГУ, к.102

РНБ Русский фонд

2007-4

7643