

$$D \cong -\lg(1 - a \cdot B + b \cdot B^2 - c \cdot B^3). \quad (21)$$

На рисунке 2 представлена аппроксимация зависимости оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей уравнением (21). Отметим, что предложенная модель с заданной степенью точности описывает отклонения от линейного закона зависимости оптической плотности культуры микроводорослей от ее биомассы. Таким образом, при пересчете величины пропускания, определенного на любом оптическом приборе, в биомассу следует использовать зависимость, вытекающую из (19):

$$B = \frac{1 - \sqrt[k]{T}}{j}, \quad (22)$$

где k и j – видоспецифичные, определённые в предварительных экспериментах константы.

Уравнение (19) является довольно упрощенным, так как не учитывает изменение размеров и содержания биохимических компонентов клеток микроводорослей в процессе роста культуры. Тем не менее, предложенный подход позволяет с достаточно высокой точностью описывать зависимость пропускания и оптической плотности культуры от биомассы микроводорослей.

Список литературы / References:

1. Chen Y., Vaidyanathan S. A simple, reproducible and sensitive spectrophotometric method to estimate microalgal lipids. *Anal. Chim. Acta*, 2012, vol. 724, pp. 67-72.
2. Collos Y., Mornet F., Sciandra A., Waser N., Larson A., Harrison P.J. An optical method for the rapid measurement of micromolar concentrations of nitrate in marine phytoplankton cultures. *J. Appl. Phycol.*, 1999, vol. 11, pp. 179-184.
3. Сидько Ф.Я., Ерошин Н.С. Определение концентрации пигментов и числа клеток во взвеси водорослей на фотоэлектроколориметре ФЭКН-57. *Управляемое культивирование микроводорослей*, М.: Наука, 1964, с. 38-42. [Sydko F.Ya., Eroshin N.S. The determination of pigments concentration and cell numbers in algae suspensions on photoelectrocolorimeter FECN-57. *Upravlyаемое kultivirovanie mikrovodorosley*. М.: Наука, 1964, pp. 38-42. (In Russ.)]
4. Геворгиз Р.Г., Алисиевич А.В., Шматок М.Г. Оценка биомассы *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. по оптической плотности культуры. *Экология моря*, 2005, вып. 70, с. 96-106. [Gevorgiz R.G., Alisevich A.V., Shmatok M.G. Estimation of *Spirulina platensis* (Nordst.) Geitl. biomass by optical density. *Ecologia morya*, 2005, vol. 70, pp. 96-106. (In Russ.)]
5. Фуряев Е.А. *Микроспектрофотометрические характеристики клеток водорослей в различных условиях культивирования*. автореф. канд. дис., Красноярск, 1979, 23 с. [Furyaev E.A. *Microspectrophotometric characteristics microalgae cells in different culture condition*. avtoref. kand. dis., Krasnoyarsk, 1979, 23 p. (In Russ.)]

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОРФОСТРУКТУРНОГО АНАЛИЗА И ЛАЗЕРНОЙ АТОМНО-ЭМИССИОННОЙ СПЕКТРОМЕТРИИ ВЫСОХШИХ КАПЕЛЬ ПЛАЗМЫ КРОВИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ РАКА ПРОСТАТЫ

Савков А.В., Сергей М.А., Булойчик Ж.И., Зажогин А.П., Мавричев А.С., Маслова Г.Т., Державец Л.А.
Белорусский государственный университет
пр. Независимости, 4, г. Минск, 220030, РБ
e-mail: zajogin_an@mail.ru

Аннотация. Исследована морфология высохшей плазмы крови больных с онкопатологией. Выявлены структурные особенности высохших капель плазмы крови пациентов с диагнозом рак простаты. Показана возможность уточнения диагноза по отнесению опухоли к типу T₂ или T₃. Получены полуколичественные результаты пространственного распределения кальция по поверхности высохшей капли биологических жидкостей и в слоях с использованием метода лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии. Показано, что метод лазерной атомно-эмиссионной спектроскопии дает возможность количественно оценить изменения в белковых центрах и является оперативным высокочувствительным инструментом в диагностике заболеваний. Полученные экспериментальные данные могут быть основой для дальнейшей разработки методологии ранней диагностики нарушения уровня функциональных резервов организма и системы реабилитационных мероприятий.

Ключевые слова: биологическая жидкость; морфология капли, лазерная атомно-эмиссионная спектроскопия; сдвоенные лазерные импульсы; пространственное распределение, послойный анализ, кальций.

**THE USE OF MORPHOSTRUCTURAL ANALYSIS AND LASER ATOMIC-EMISSION
SPECTROMETRY OF THE DRIED BLOOD PLASMA DROPS FOR DIAGNOSIS OF PROSTATE
CARCINOMA**

Savkov A.V., Sergey M.A., Bulovich J.I., Zajogin A.P., Mavrichev A.S., Maslova G.T., Derzhavets L.A.
Belarusian State University
Nezavisimosti Ave., 4, Minsk, 220030, Belarus
e-mail: zajogin_an@mail.ru

Abstract. The morphology of the dried blood plasma drops from the patients with oncopathology has been studied. The structural features characteristic for the dried blood plasma drops from the patients with diagnosed prostate carcinoma have been revealed. It has been demonstrated that diagnosis may be identified better due to the possibility to attribute a tumor to the type T₂ or to the type T₃. Semiquantitative results for the spatial distribution of calcium over the surface of the dried drop of a biological fluid and within the layers have been obtained using the laser atomic-emission spectrometry method. As shown, this method enables one to assess quantitatively the changes in albuminous centers and may be an effective diagnostic instrument. Based on the obtained experimental data, the early diagnostic technique for disorders in the functional reserves of a human organism may be improved and the adequate rehabilitation measures may be suggested.

Key words: biological fluid; drop morphology; laser atomic-emission spectrometry; double laser pulses; spatial distribution; layer-by-layer analysis; calcium.

Диагностика рака предстательной железы – одна из наиболее важных проблем современной онкологии. Общеизвестно, что развитие злокачественной опухоли – процесс мультифакторный, сопряженный с нарушением или перестройкой большей части внутриклеточных механизмов. В связи с этим составить представление о течении процесса лишь по одному маркеру практически невозможно. Приоритетной задачей в настоящее время является не разработка способов применения каждого маркера в отдельности, а создание набора из доступных маркеров, способного достаточно подробно дать характеристику опухоли [1].

В связи с этим существует настоятельная необходимость в разработке методов, которые могли бы обеспечить раннее выявление заболевания, оценить степень развития процесса, осуществить контроль эффективности проводимой терапии и позволить вести динамическое наблюдение за состоянием пациентов.

В последние десятилетия все большее применение в медицинской диагностике находят методы исследования структур, образованных при кристаллизации солей в биологических жидкостях (БЖ) (кровь, плазма крови, спинномозговая жидкость, слюна). Явление дегидратационной самоорганизации БЖ позволило авторам более 30 лет назад использовать внешний вид фации (высушенная капля БЖ) в диагностических целях [2-4].

В настоящее время на практике для диагностики используется метод «клиновидной дегидратации» БЖ [4]. Метод обладает неоспоримыми достоинствами для диагностики различных заболеваний человека на доклинической стадии, хотя процесс распознавания характера структурирования биологических жидкостей в большой мере зависит от опыта и навыка прочтения изображения фации врачом-исследователем. За исключением отдельных запатентованных способов диагностики заболеваний по особенностям структуризации БЖ, большая часть исследований находится на стадии феноменологического описания. Недостаточно обоснованы механизмы дегидратационной самоорганизации БЖ, обуславливающие особенности формирования структуры твердой фазы БЖ.

В этой связи, очевидно, что исследования структуризации твердой фазы БЖ перспективны для диагностического использования в самых разнообразных областях медицины. Для выбора интегральных критериев оценки пространственного распределения неорганических солей в фации важно понимание основных закономерностей развития пространственно-временных событий в высыхающих и высохших каплях, что может способствовать реальной оценке состояния организма и созданию новых инструментальных методов диагностики.

При высыхании капли БЖ протекает множество разнообразных процессов различной природы от нано- до макроуровня. В частности, происходит перераспределение компонентов: белок накапливается преимущественно по краям капли, в то время как соль более или менее равномерно распределена по диаметру капли [6, 7].

Метод диагностики на основе дегидратации капли крови состоит в том, что при высыхании капли в случае нормы возникают регулярные и однородные структуры (радиальное растрескивание). При малейшей патологии происходит нарушение структуры белков, начинаются процессы их агрегации, сопровождающиеся возникновением аномальных и нерегулярных структур (конкреции, трещины). Микронарушения структуры белков на молекулярном уровне вызывают нарушение на макроуровне. Если в норме всего 2% белков имеют нарушения в третичной или четвертичной структуре, то при патологии к изменению в структуре имеют отношение до 50 % белков [7].

Проблема рака предстательной железы в последние годы привлекает внимание все большего числа исследователей. Причина этому - стойкая тенденция роста заболеваемости, особенно, в урбанистических и индустриально развитых районах и странах.

В настоящей работе изучена динамика структурирования высыхающей капли плазмы крови больных с диагнозом рак предстательной железы. Каплю плазмы крови (10 мкл) наносили на обезжиренную пластинку из оргстекла и изучали динамику временно-структурных изменений высыхающей капли. Процесс сушки вели при комнатной температуре 18-20 °С.

Для получения снимков высохших капель плазмы крови использовали оптический микроскоп Webbers, совмещенный с цифровой камерой (отраженный свет), и микроскоп Биолам со светодиодной подсветкой (на пропускание) и веб-камерой. Оба микроскопа имеют видеонасадки, работающие с компьютером по USB-2 порту.

Диагностику капли проводили с 40 минуты, когда примерно начинается процесс структурирования, изменения в структуре фиксировали каждые 10 минут до полного высыхания капли.

На рисунке 1 приведены снимки высыхающих капель плазмы крови пациентов с диагнозом рак предстательной железы того или иного типа, полученные на 90 минуте (1а-г), полностью высохшей капли через 24 часа (см. рис. 2а-г) и фрагмент центральной части капли (увеличение 120 раз – на пропускание) (см. рис. 3а-г).

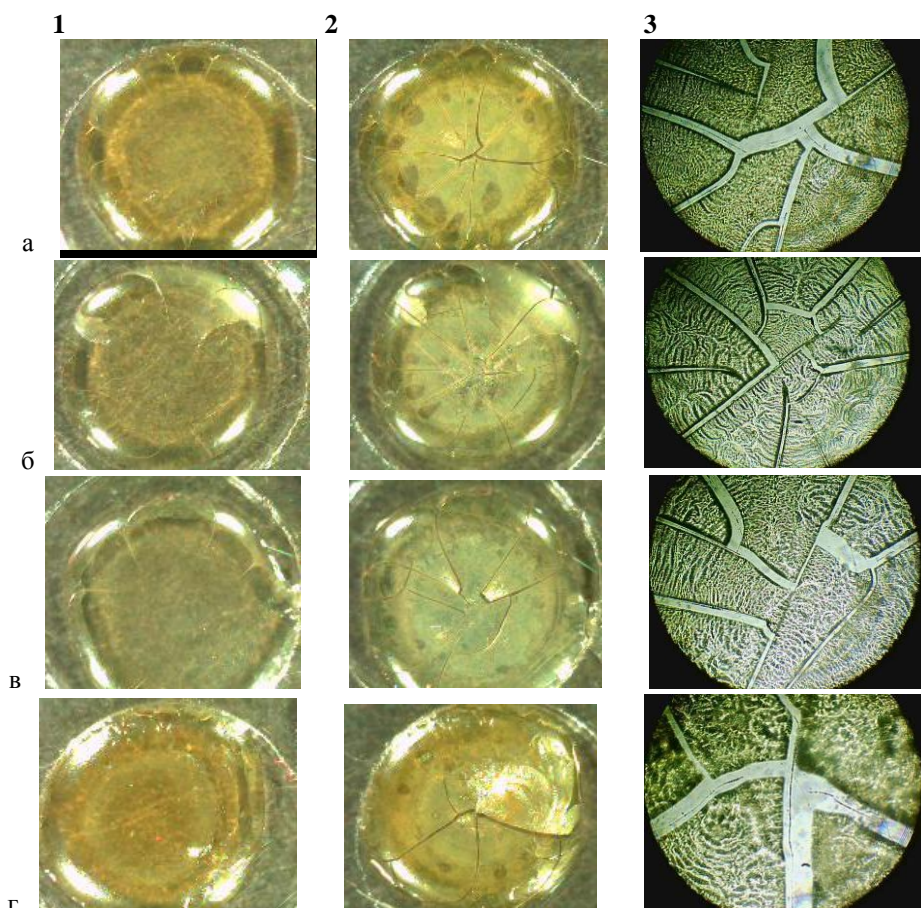


Рисунок 1 – Динамика структуризации капли плазмы крови пациентов *а, б, в* и *г* с диагнозом рак простаты

В процессе высыхания уже одновременно с началом дегидратации капли происходит зарождение темных пятен, размер их увеличивается вплоть до полного высыхания капли. Это связано с возникновением центров выпадения белков, которые формируются в виде темного осадка от внутренней части дуговых трещин и распространяются к центру капли. Такое же движение фронта к центру происходит при образовании поперечных трещин и ячеек. Если ячеек не образуется, то фронт распространяется к центру капли по секторам.

Насыщенность осаждающихся белков не является постоянной. Изменение насыщенности цвета осадка зависит как от скорости движения фронта осаждения, так и от размера выпадающих агрегатов. Чем медленнее движение фронта, тем насыщеннее осадок. Симметричное радиальное расположение трещин и их пересечение в окрестности центра фации, как правило, характеризует процесс высыхания капли здорового человека [8-10].

Анализ структуры высохших капель плазмы крови всех пациентов показывает, что капли при окончательном высыхании имеют схожий краевой белковый валик, а в центральной части хаотично разбросаны псевдотрещины и темные локальные блоки.

Но на снимках с увеличением рисунка видно, что морфоструктура образца плазмы крови пациента *г* существенно отличается. Наблюдается большое количество завитков, практически отсутствующих на снимках *а, б* и *в*. Если при поступлении диагноз первых трех пациентов – рак простаты типа Т2, то диагноз четвертого пациента - аденокарцинома простаты типа Т_{3в} N₁ M₀.

Учитывая то, что по статистике в 50 % случаев опухоли Т2 ошибочно принимаются за Т3, крайне важно в такой ситуации сохранять спокойствие и проводить дополнительные исследования.

Этому в значительной степени могут поспособствовать исследования и сравнения пространственного распределения Са как у потенциально здоровых лиц, так и у онкологических больных. Этот элемент является одним из жизненно необходимых элементов (ЖНЭ) человека и, более того, преимущественно его ионы связаны с белками [7].

Локальное пространственное распределение кальция в высохших каплях плазмы крови экспериментально изучено нами методом лазерной многоканальной спектроскопии. Исследования проводили с использованием лазерного многоканального атомно-эмиссионного спектрометра LSS-1. Лазерное излучение фокусируется на образец с помощью ахроматического конденсора с фокусным расстоянием 100 мм. Размер пятна фокусировки примерно 50 мкм. Все эксперименты проводили в атмосфере воздуха при нормальном атмосферном давлении. Анализировали суммарные результаты действия 5 последовательных сдвоенных лазерных импульсов (СЛИ). Энергия лазерного излучения составляла 34 мДж (первый и второй импульсы, соответственно), временной интервал между сдвоенными импульсами – 8 мкс. Абляция осуществлялась через 0,6 мм. Размер точки повреждения примерно 0,10-0,15 мм. По диаметру пробы анализ проводили в 12 точках поверхности. Диаметр высохшей капли примерно 6 мм.

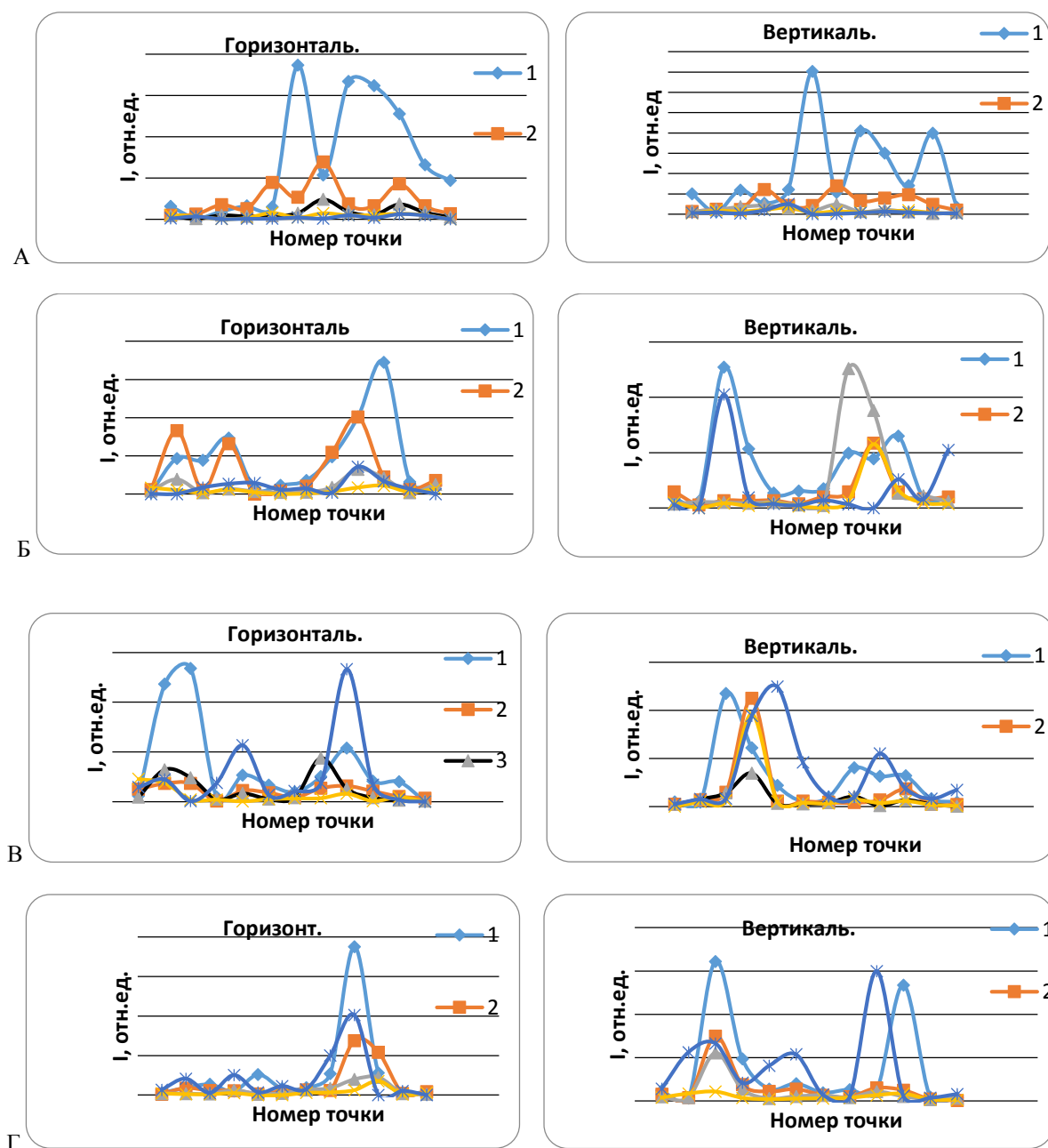


Рисунок 2 – Интенсивность линии Са в атомно-эмиссионных спектрах высохших капель плазмы крови

Изучена интенсивность линии Ca II (393,239 нм) в спектрах высушенных капель плазмы крови в зависимости от положения точки на поверхности капли и в слое. Распределение кальция исследовано по двум перпендикулярным диаметрам с акцентом на такое их расположение, где наблюдались аномалии в структуре (дефекты).

На рисунке 2 представлена интенсивность линии Ca II (393,239 нм) в спектрах высушенных капель плазмы крови по диаметрам (вертикальный, горизонтальный) как по поверхности капли, так и по слоям. В столбце справа – номер слоя в точке по диаметру капли. Порядок расположения рисунков соответствует анализируемым образцам плазмы крови четырех пациентов.

При сравнении приведенных графиков обнаруживаются заметные отличия в распределении кальция в зависимости от диагноза. В каплях пациента А с онкологическим диагнозом рак простаты типа T_{2c} N₀ M₀ пусть не достаточно равномерная, но максимальная интенсивность кальция наблюдается именно на поверхности капли, причем практически на большей ее части.

У пациентов Б и В заметно повышение содержания кальция в нескольких нижних слоях. Так, у больного Б наблюдается рост интенсивности в точке 8 в третьем слое. В высохшей капле плазмы крови пациента В присутствуют довольно резкие всплески повышения концентрации во втором и пятом слое.

Характер локального распределения кальция в высохшей капле плазмы крови пациента с диагнозом рак простаты типа T_{3b} N₁ M₀ имеет заметные отличия. Максимальное содержание кальция приходится на самый нижний, пятый слой капли. По-видимому, аномальное содержание кальция именно в нижнем слое способствует более быстрой коагуляции белка, меняет морфологию структурирования в процессе высыхания капли и может быть индикатором степени прогрессирования заболевания.

Анализ пространственного и, в частности, послойного содержания кальция в высохшей капле плазмы крови, в совокупности с морфоструктурными данными, позволяет оценивать относительное состояние организма больного. Можно предположить, что состояние второго и третьего пациента хуже, чем первого, но лучше, чем четвертого.

Хотя для систематизации результатов требуется набор статистических данных, однако полученные данные демонстрируют различия в содержании кальция как на поверхности, так и в слоях высохшей капли в зависимости от диагноза. Использование метода ЛАЭМС для анализа высохшей капли БЖ могут быть перспективны для полуколичественной оценки распределения эссенциальных элементов в ней и, возможно, помогут поиску маркеров заболеваний. Результаты таких оценок могли бы служить основой при проведении предварительных диагностических исследований, поскольку на начальных стадиях развития болезни общее содержание макроэлементов в БЖ пациентов, как правило, лежит в пределах нормы.

Таким образом, данные морфоструктурного анализа высыхающей капли плазмы крови, определяющие различия образующихся структур в процессе высыхания капли БЖ, оценка пространственного распределения ЖНЭ в высохшей капле, дают возможность выявить серьезные заболевания и в сомнительных случаях уточнить степень патологии, например, при постановке диагноза аденокарцинома T₂ или T₃.

Учитывая относительную простоту выполнения анализа, не требующего больших временных затрат и дорогостоящего оборудования, возможно предварительное формирование групп риска больных для дальнейшей диагностики с подключением более специфических и сложных медицинских методов.

Список литературы / References:

1. Аляев Ю.Г., Безруков Е.А., Шестиперов П.А. Молекулярная патология рака предстательной железы: диагностическая и прогностическая значимость основных маркеров. *Онкоурология*, 2006, № 2, с. 45-50. [Alyayev Yu.G., Bezrukov E.A., Shestiperov P.A. Molecular pathology of prostate carcinoma: diagnostic and prognostic significance of the main markers. *Oncourology*, 2006, no. 2, pp. 45-50. (In Russ.)]
2. Рапис Е.Г. Использование метода поляризационной микроскопии для исследования хрусталика. *Вестник офтальмологии*, 1976, № 2, с. 128-130. [Rapis E.G. Using of the polarization microscopy method for examination of eye lens. *J. of Ophthalmology*, 1976, no. 2, pp. 128-130. (In Russ.)]
3. Рапис Е.Г. Микросталлооптический способ исследования стекловидного тела человека и животных в норме и при гемофтальме. *Вестник офтальмологии*, 1976, № 5, с. 62-67. [Rapis E.G. The microcrystallooptical method to study a vitreous body of humans and animals in the norm and in the case of hemophthalmia. *J. of Ophthalmology*, 1976, no. 5, pp. 62-67. (In Russ.)]
4. Рапис Е.Г. Образование упорядоченной структуры при высыхании пленки белка. *Письма в ЖТФ*, 1988, т. 14 (17), с.1560-1564. [Rapis E.G. The ordered structure formation on drying of an albumin film. *Letters to JTP*, 1988, vol. 14 (17), pp.1560-1564. (In Russ.)]
5. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. *Морфология биологических жидкостей человека*. М.: Хризостом, 2001, 303 с. [Shabalin V.N., Shatokhina S.N. *The morphology of human biological fluids*. М.: Chrysostom, 2001, 303 p. (In Russ.)]
6. Максимов С.А. Морфология твердой фазы биологических жидкостей как метод диагностики в медицине. *Бюллетень сибирской медицины*, 2007, № 4, с. 80-85. [Maximov S.A. Morphology of the solid state of biological fluids as a diagnostic method in medicine. *Bulletin of Siberian Medicine*, 2007, no. 4, pp. 80-85. (In Russ.)]
7. Тарасевич Ю.Ю., Аюпова А.К. Влияние диффузии на разделение компонентов биологической жидкости при клиновидной дегидратации. *ЖТФ*, 2003, т. 73 (5), с. 13-17. [Tarasevich Yu.Yu., Ayupova A.K. The diffusion

effect on separation of the components of a biological fluid in the case of clinoid dehydration. *JTP*, 2003, vol. 73 (5), pp. 13-17. (In Russ.)]

8. Тарасевич Ю.Ю., Исакова О.Л., Кондухов В.В., Савицкая А.В. Влияние режима испарения на пространственное перераспределение компонентов в испаряющейся капле жидкости на твердой горизонтальной подложке. *ЖТФ*, 2010, т. 89 (5), с. 45-50. [Tarasevich Yu.Yu., Isakova O.L., Kondukhov V.V., Savitskaya A.V. The evaporation mode influence on the spatial redistribution of the components in the evaporating drop of fluid on the solid horizontal substrate. *JTP*, 2010, vol. 89 (5), pp. 45-50. (In Russ.)]

9. Гольбрайх Е., Рапис Е.Г., Моисеев С.С. О формировании узора трещины в свободно высыхающей пленке водного раствора белка. *ЖТФ*, 2003, т. 73 (10), с. 118-122. [Holbreich E., Rapis E.G., Moiseev S.S. On the formation of the fracture pattern in a free drying film of the albumin aqueous solution. *JTP*, 2003, vol. 73 (10), pp. 118-122. (In Russ.)]

10. Кизель В.А. *Физические причины десимметрии гелевых систем*. М.: Наука, 1985, 120 с. [Kizel V.A. *The physical causes of asymmetry in gel systems*. М.: Nauka, 1985, 120 p. (In Russ.)]

11. Краевой С.А., Колтовой Н.А. *Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей*. Книга 1 – Открытая капля, 2013, с. 67-71. [Kraevoi S.A., Koltovoi N.A. *Diagnostication by a drop of blood. Crystallization of biological fluids*. Book 1 – Exposed drop, 2013, pp. 67-71. (In Russ.)]

КЛЕТОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ ВОЗДЕЙСТВИЯ НЕЙТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

Кузнецов К.А., Бережной А.Ю., Кизим П.С., Онищенко Г.М., Шкорбатов Ю.Г.

Харьковский национальный университет им. В.Н. Каразина

пл. Свободы, 4, г. Харьков, 61022, Украина

e-mail: Co-Smith@yandex.ru

Аннотация. С помощью методики определения степени конденсации хроматина в ядрах клеток буккального эпителия человека показана реакция на воздействие нейтронного излучения с разным временем экспозиции. В качестве источника нейтронного излучения были использованы два Pu-Be источника ИБН-17 (Россия). Диапазон энергий испускаемых нейтронов: 100 кэВ – 10 МэВ, поток нейтронов одного источника $5 \cdot 10^7$ нейтр./с, излучение изотропно, расстояние до образца – 5 см. Облучение проб клеток происходило на протяжении 1 – 64 мин. Обработанные клетки окрашивались 2% раствором орсеина в 45% уксусной кислоте. Содержание гранул гетерохроматина (СГГ) определяли в ядрах 100 клеток и по среднему количеству гранул в ядре определяли степень конденсированности хроматина. Установлена нелинейная зависимость показателя конденсированности хроматина в ядре (стрессовой реакции клетки). Максимального значения изучаемый показатель достигал при 16-минутном облучении, дальнейшее увеличение времени облучения приводило к снижению показателя. Полученные данные проанализированы на соответствие одноударной и двухударной моделям распределения Пуассона, а также распределению Гаусса и Вигнера. Установлено, что распределение Пуассона в качестве модели радиационных повреждений наиболее точно отображает наблюдаемые изменения в клетках.

Ключевые слова: клеточный стресс, гетерохроматин, нейтронное излучение, распределение Гаусса.

CELLULAR EFFECTS OF NEUTRON RADIATION EXPOSURE

Kuznetsov K.A., Berezhnoy A.Y., Kyzym P.S., Onishchenko G.M., Shkorbatov Y.G.

V.N. Karazin Kharkiv National University, Kharkiv, Ukraine

Svobody Sq., 4, Kharkov, 61022, Ukraine

e-mail: Co-Smith@yandex.ru

Abstract. The answer to neutron radiation of different exposure time was demonstrated in nuclei of isolated human buccal epithelial cells by the method of assessment of the degree of chromatin condensation. As a neutron radiation source two sources Pu-Be IBN-17 (Russia) have been used. The range of emitted neutrons energies was 100 keV - 10 MeV, the neutron flux $5 \cdot 10^7$ n/s, the irradiation was isotropic. Cell samples were exposed to radiation during 1 - 64 minutes. Exposed cells were stained with 2% orcein in 45% acetic acid. The content of the heterochromatin granules quantity (HGQ) was counted in nuclei of 100 cells, and the mean number of HGQ per nucleus was determined as a measure of chromatin condensation. The nonlinear dependence of chromatin condensation in the nuclei (cell stress reaction) from irradiation time was observed. The maximum value of HGQ reached after 16-minute exposure, further increase of the exposure time lead to decrease of HGQ. The data has been analyzed for compliance with the single- and double-hit models of the Poisson distribution, as well as the Gaussian and Wigner distributions. It is found that the Poisson distribution as a model of radiation impact reflects changes in cell reaction of chromatin condensation most accurately.

Key words: cell stress, heterochromatin, neutron radiation, Gauss distribution.

Биологические эффекты корпускулярных видов ионизирующих излучений, как правило, более выражены, чем таковые, производимые рентгеновским и гамма-излучением. В дозиметрии предполагается, что действие нейтронного излучения, в зависимости от энергетического диапазона частиц, приблизительно в 2-20 раз сильнее гамма-излучения [1].