

**Комбинированное действие
излучения и импульсного
электрического поля
на биологические мембраны**

- **МГУ им. М.В. Ломоносова, физический факультет, НИИЯФ**
- **Московская медицинская академия им. И.М.Сеченова, кафедра медицинской и биологической физики**
- **НИИ общей реаниматологии РАМН**

Работы в данной области поддержаны грантом Правительства Москвы (2002), грантом научной программы «Университеты России» («Повышение эффективности облучения биологических объектов ионизирующим излучением») (2004).

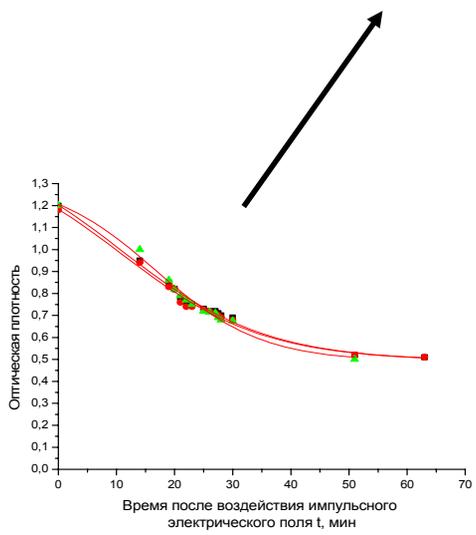
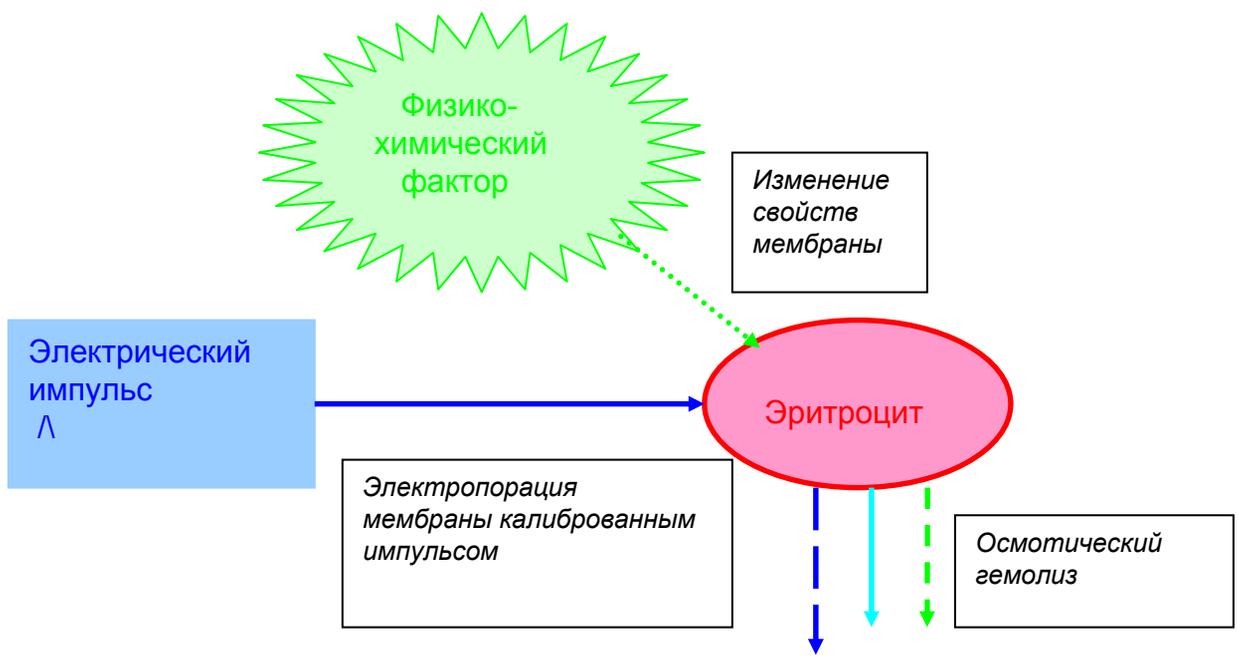
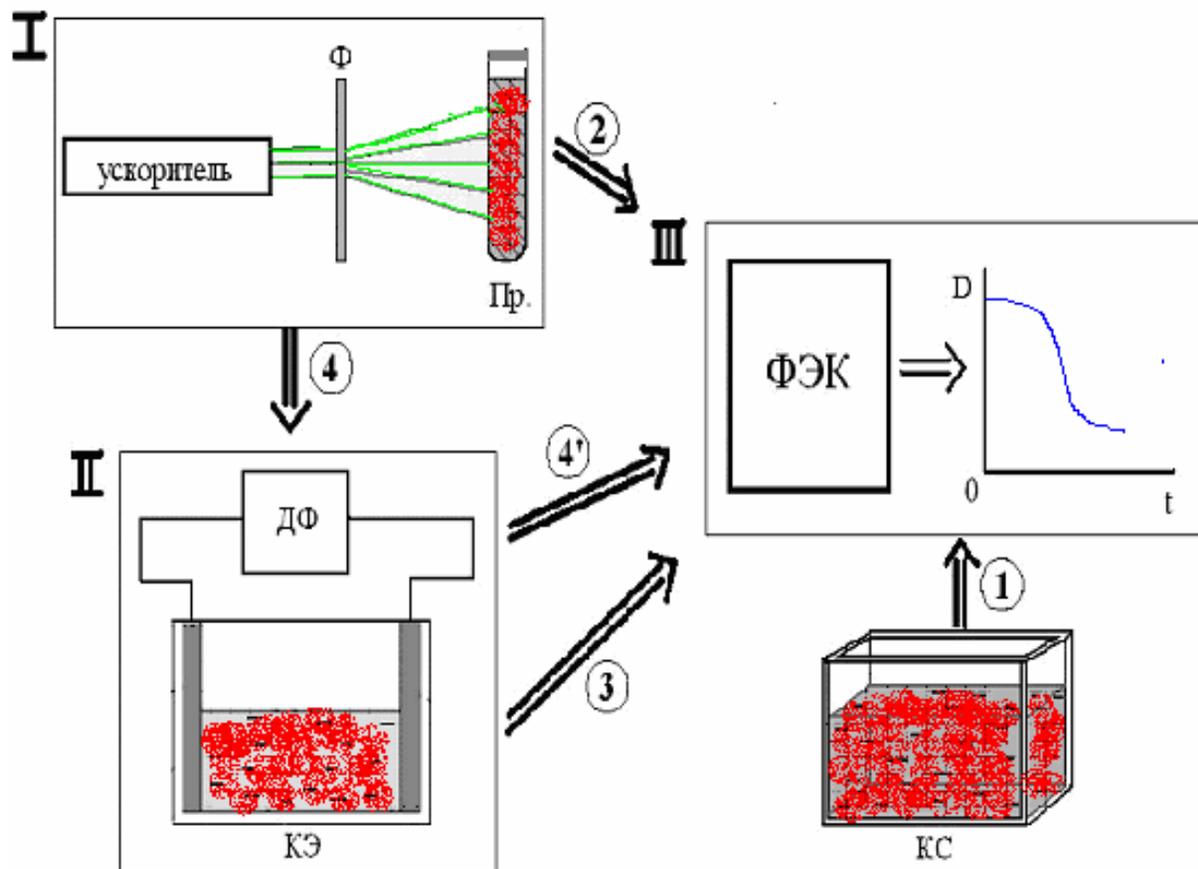
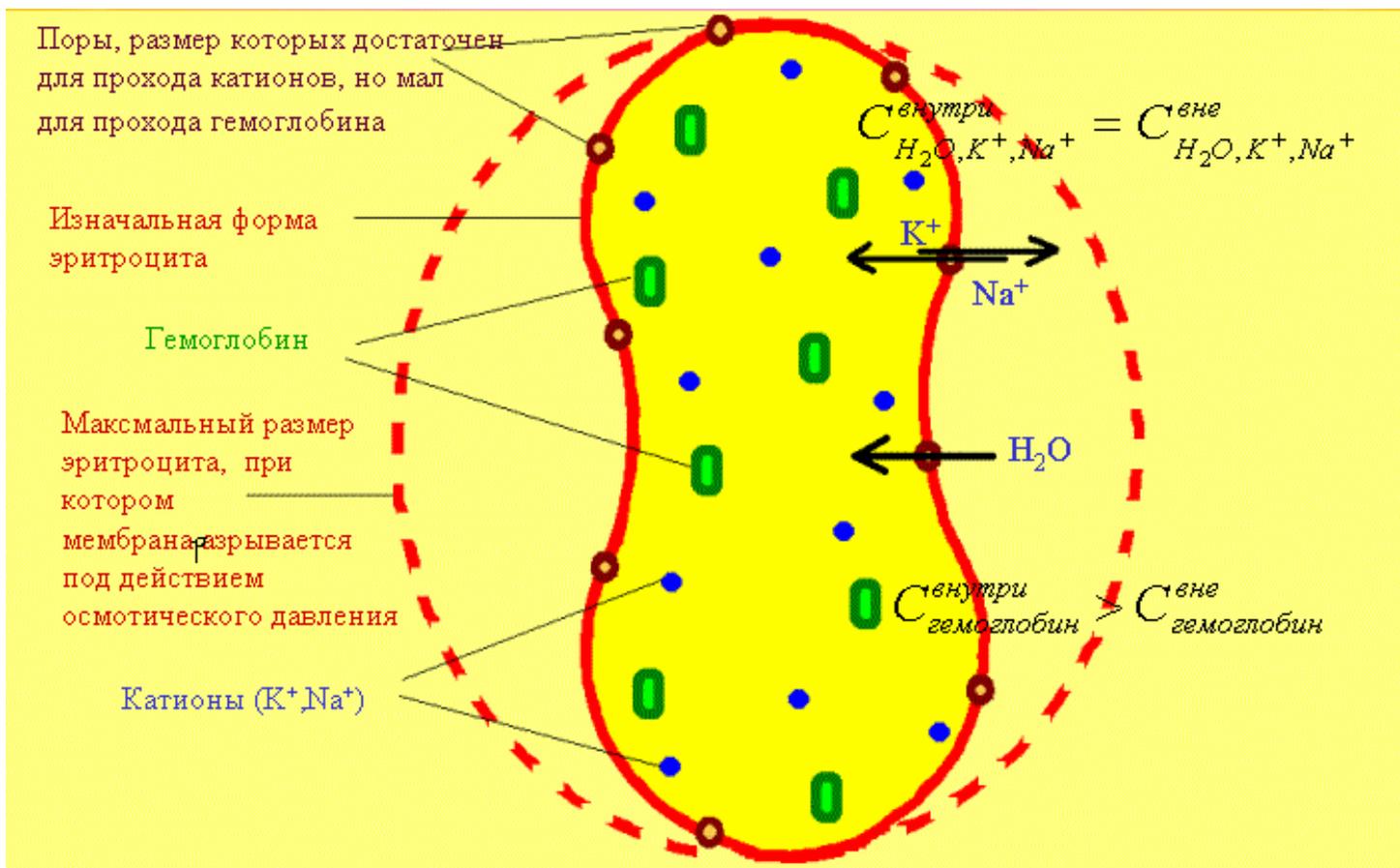


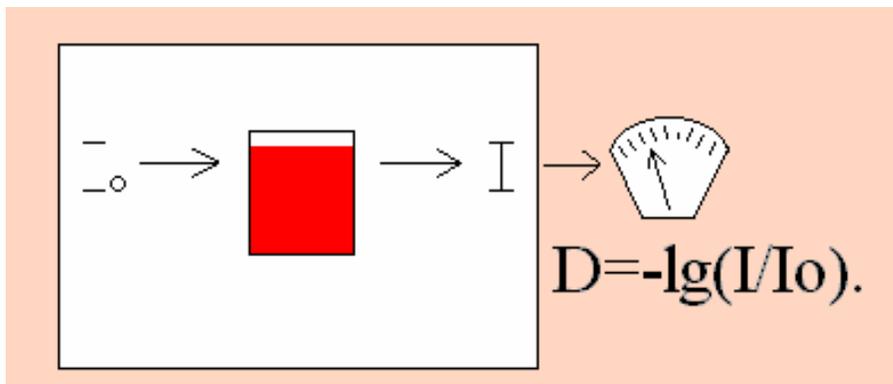
Схема опытов по комбинированному воздействию ионизирующего излучения и импульсного электрического поля на суспензию эритроцитов



Механизм коллоидно-осмотического гемолиза эритроцитов

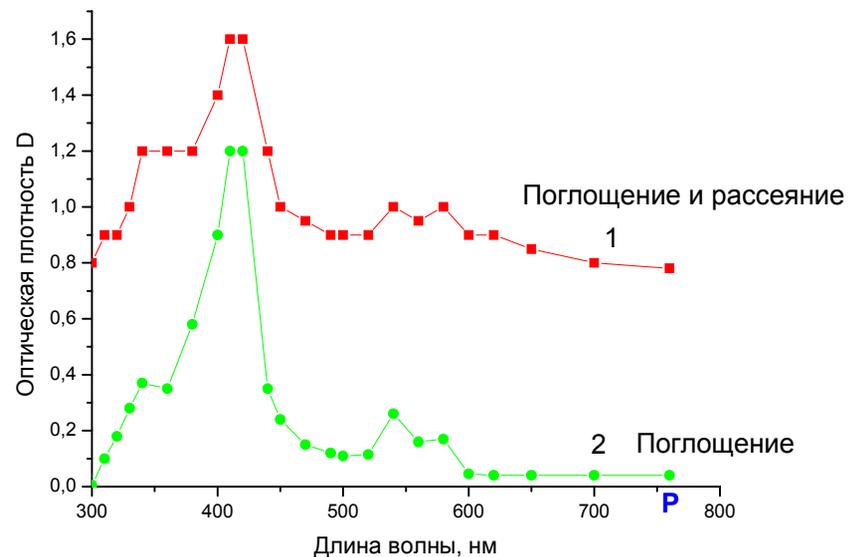
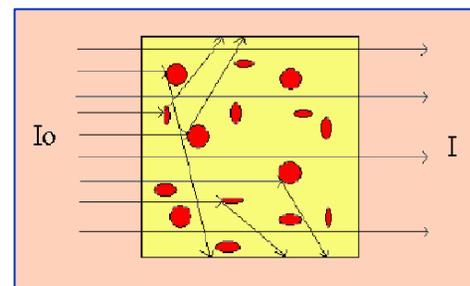


Определение концентрации эритроцитов в суспензии

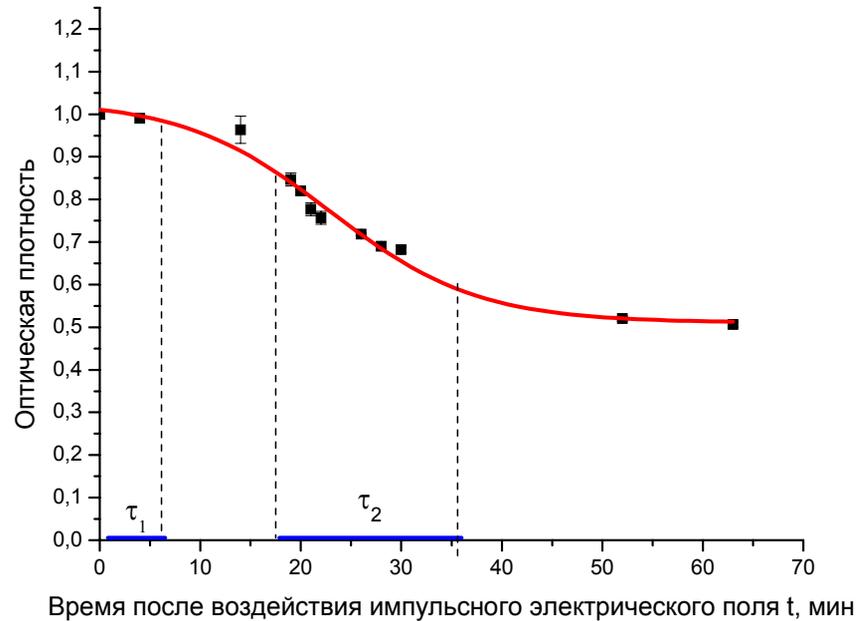


Количество вещества определяли по оптической плотности раствора:

$$D_p = -\lg(I/I_0) = \varepsilon Cl$$



Кинетическая кривая в результате электропорации



$$N(t) = N_0 \exp(-\beta t)$$

$$\tau_1 - \beta \approx 0$$

$$\tau_2 - \beta \approx 0,017 \text{ мин}^{-1}$$

Схема экспериментальной установки для воздействия импульсным электрическим полем на эритроциты в суспензии

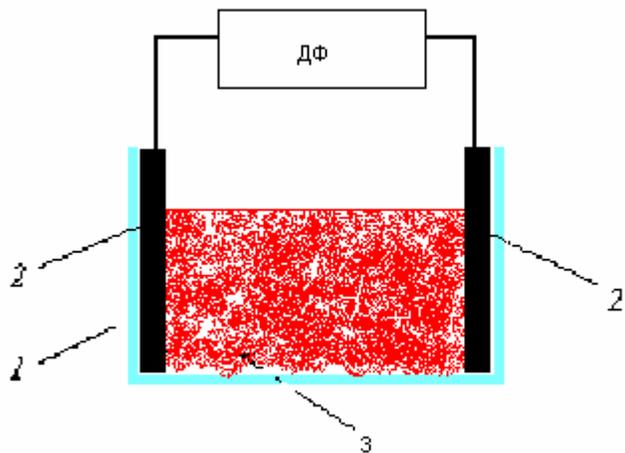


Фото 1. Экспериментальная установка.

В качестве источника импульсного электрического поля использовался клинический дефибриллятор Lifepak-7 (USA) и ДИ-03 (РФ). Электрический импульс подводился к силовым титановым электродам 2, помещенным в кварцевую кювету 1, в которую наливали суспензию эритроцитов в физиологическом растворе 4.

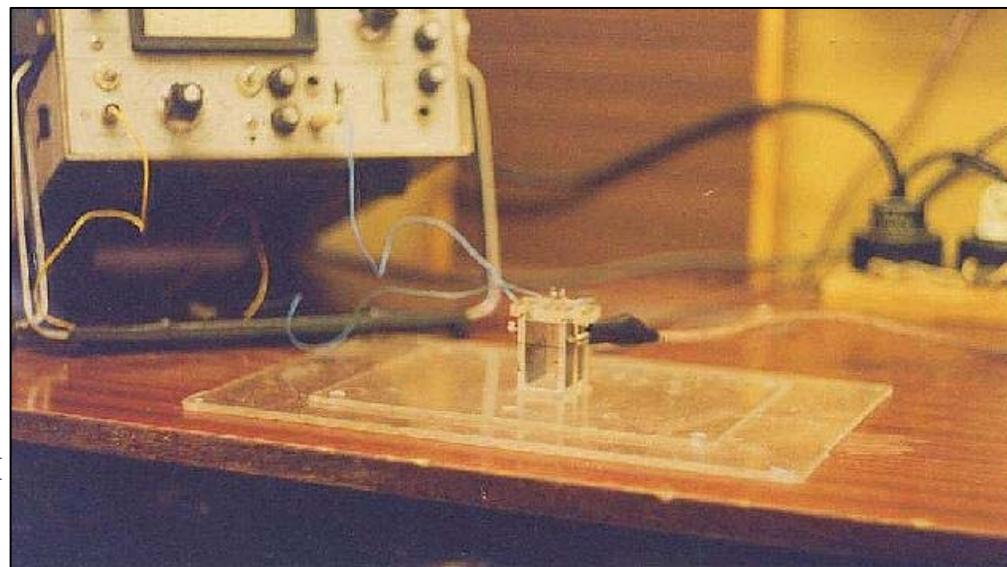
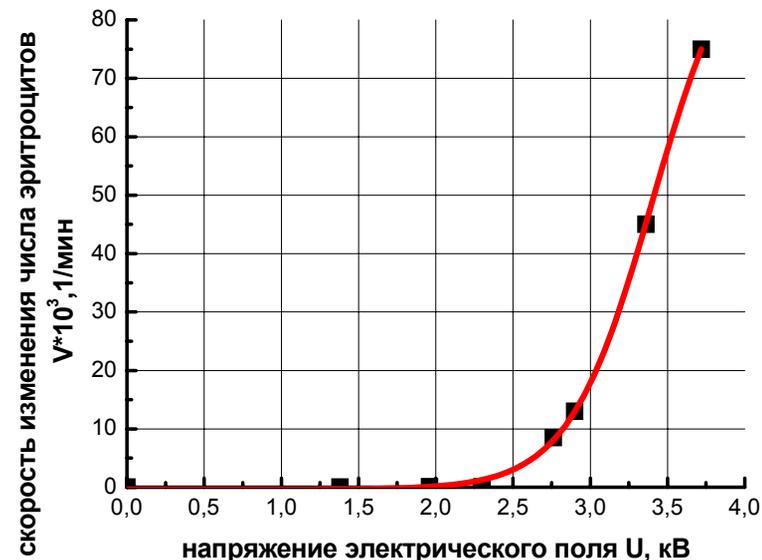
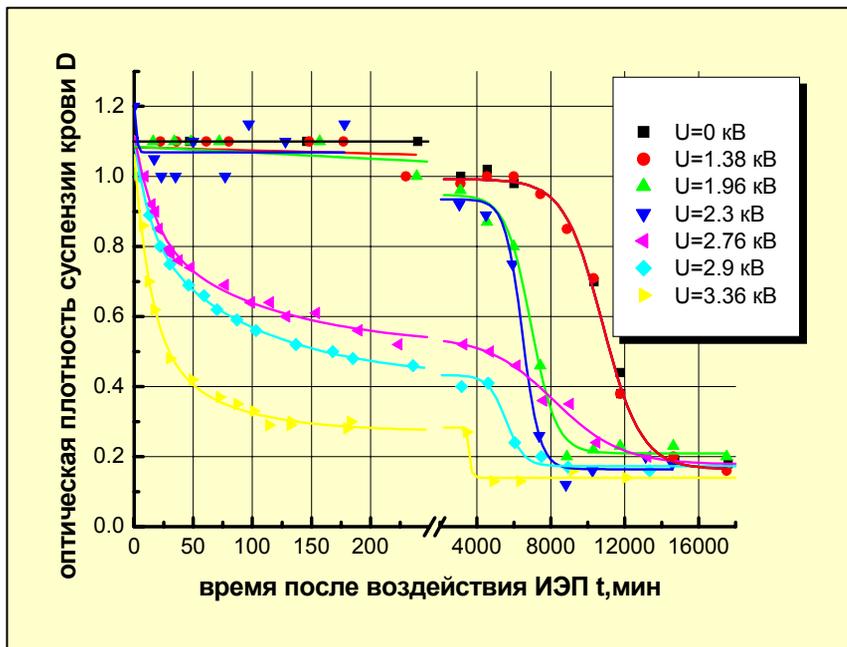


Фото 2. Кювета с электродами.

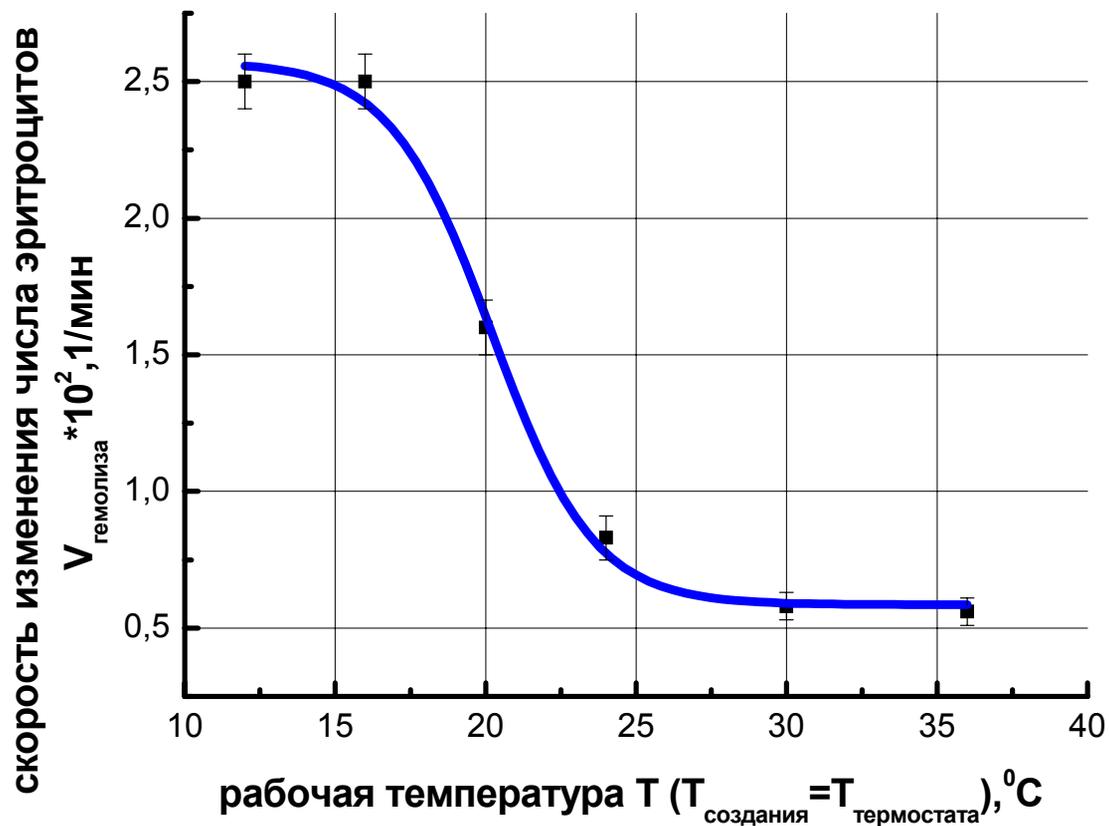
Электропорация эритроцитов при воздействии импульсного электрического поля



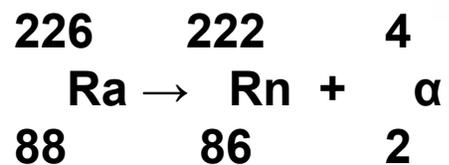
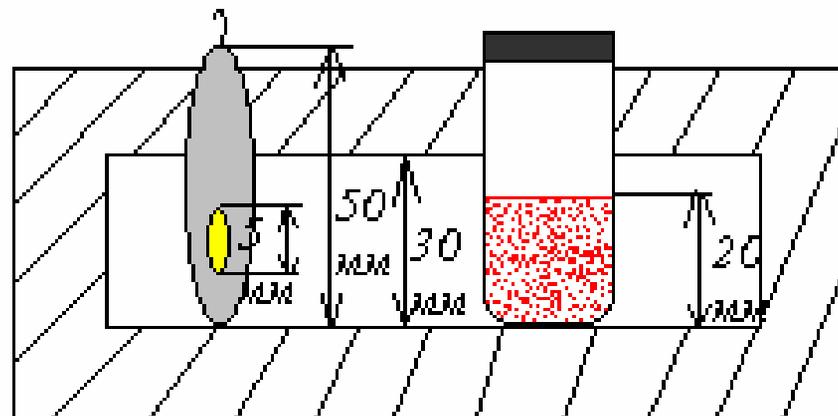
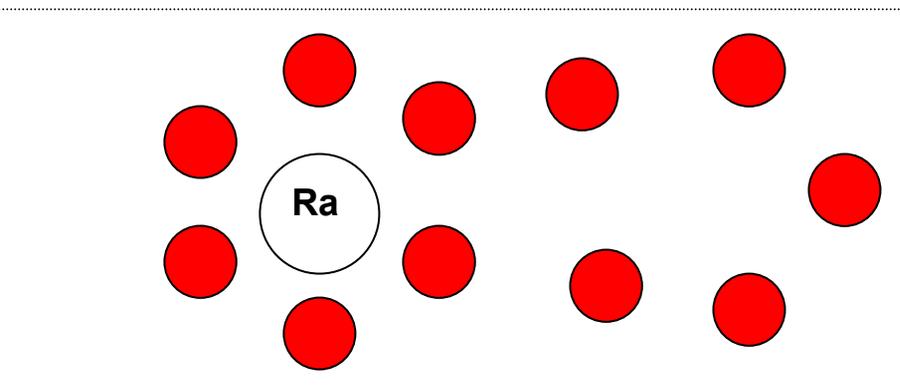
- а) Кинетические кривые в результате воздействия ИЭП для разных значений разности потенциалов между электродами ($U=0, 1.38, 1.96, 2.3, 2.76, 2.9, 3.36$ кВ)

- б) Зависимость скорости изменения числа эритроцитов V от напряжения электрического поля (0-3.72 кВ) в результате воздействия ИЭП

Влияние температуры на константу скорости уменьшения числа эритроцитов при воздействии на них импульсного электрического поля



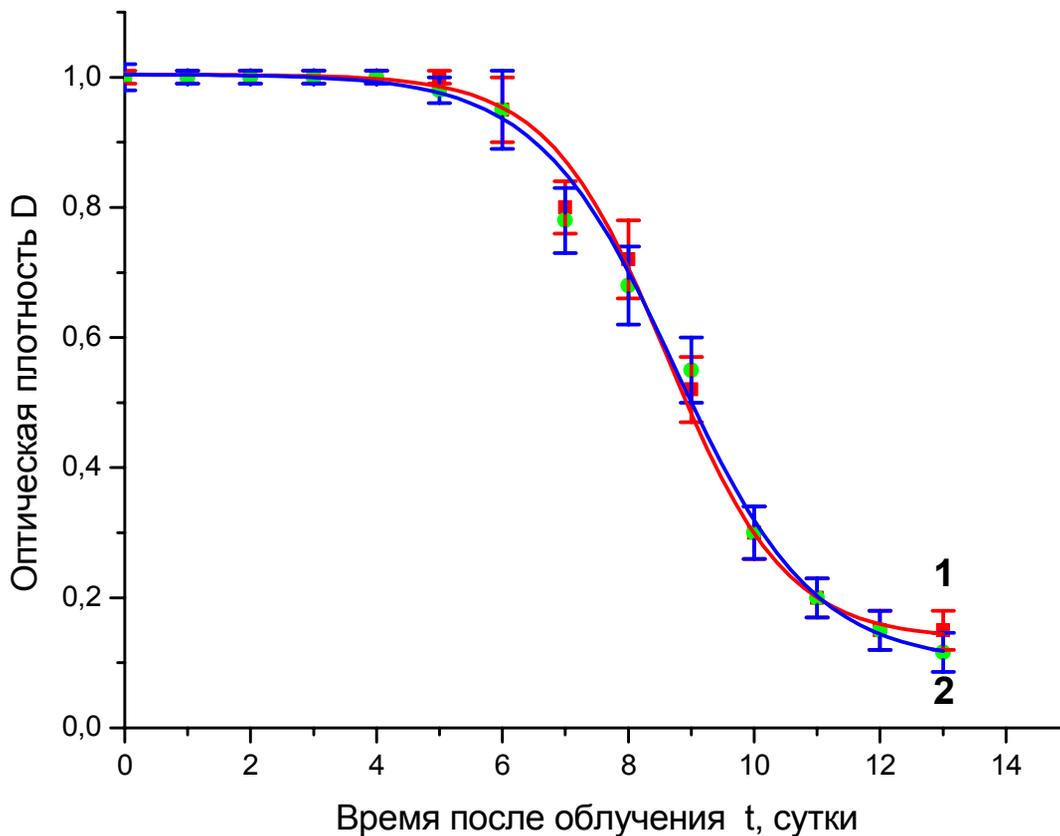
Облучение суспензии эритроцитов γ -излучением ^{226}Ra



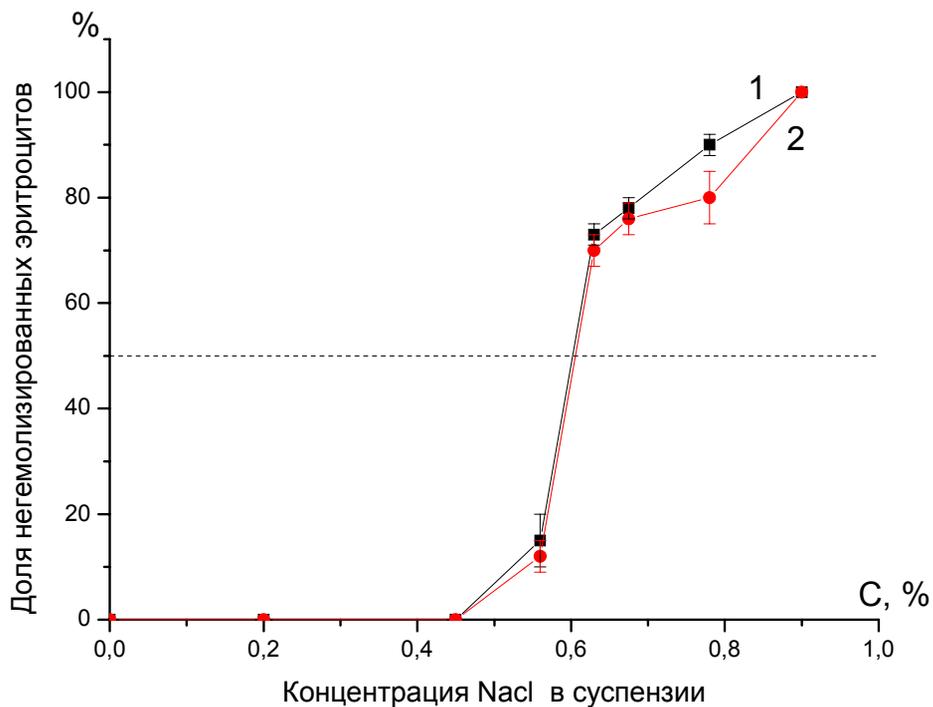
γ -излучение:

0,186 ; 0,188; 0,660; 0,26 МэВ

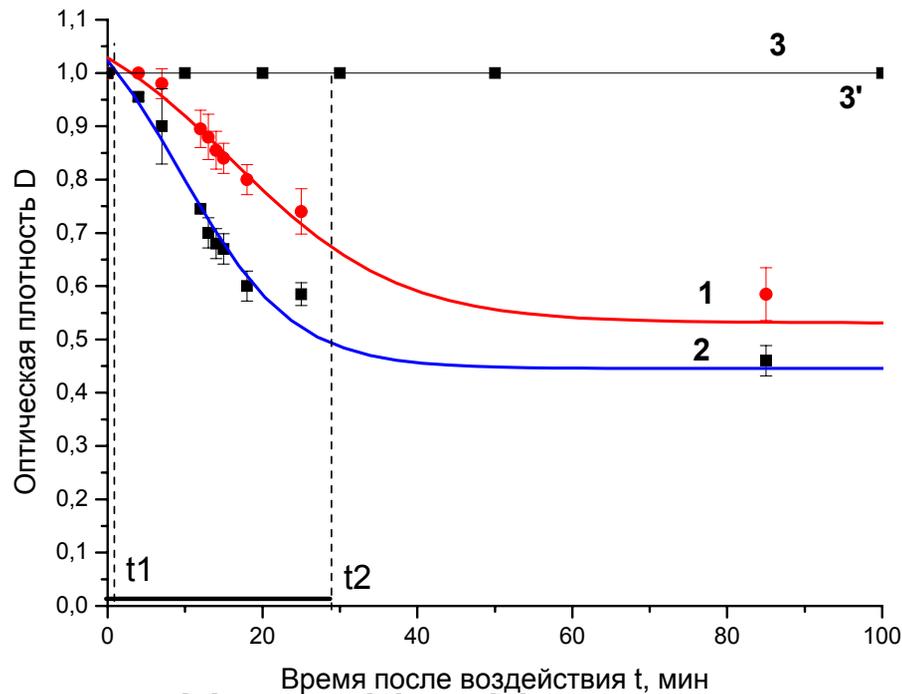
Зависимость оптической плотности суспензии от времени после облучения: 1 – контрольная суспензия без облучения, 2 – суспензия после воздействия γ -излучения, доза 5 рад



Метод осмотической резистентности. Зависимость доли негемолизированных эритроцитов в суспензии от концентрации соли NaCl. Первые сутки: 1 – контрольная суспензия, 2 – суспензия после облучения, доза 5 рад



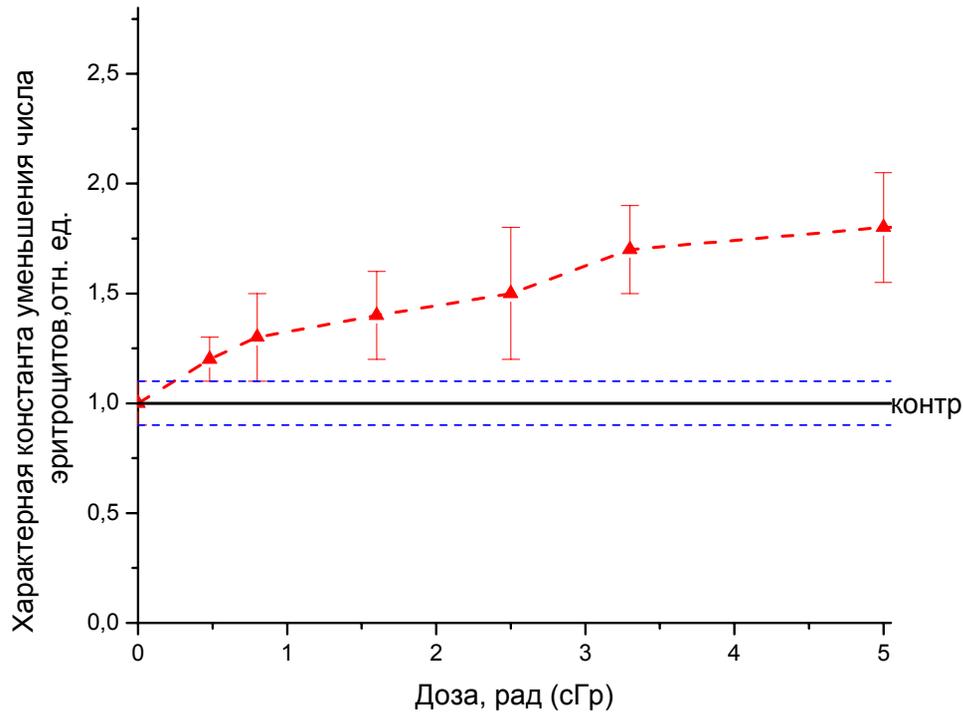
Кинетические кривые изменения числа эритроцитов в суспензии $t=20 - 21$ 0С:
Кривая 1 – контрольная суспензия после электропорации калиброванным импульсом (без облучения), кривая 2 – облучение источником (доза 5 рад), затем электропорация калиброванным импульсом, кривая 3 – после облучения без электропорации, кривая 3' – без облучения и без электропорации



$$V_{\gamma+E} > V_E + V_{\gamma}$$

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

Экспериментальные данные для нормированной константы скорости уменьшения числа эритроцитов $\beta_{\gamma+E}/(\beta_{\gamma} + \beta_E)$ в результате комбинированного воздействия γ -излучения и импульсного электрического поля в зависимости от дозы для разных Пунктиром указаны ошибки контроля



Гистограмма значений констант скорости уменьшения числа эритроцитов λ для доноров А, В, С; А, В, С - столбцы – суспензия, подвергавшаяся воздействию импульса электрического поля, А_γ, В_γ, С_γ - столбцы – суспензия, предварительно подвергавшаяся воздействию γ -излучения, а затем импульса электрического поля

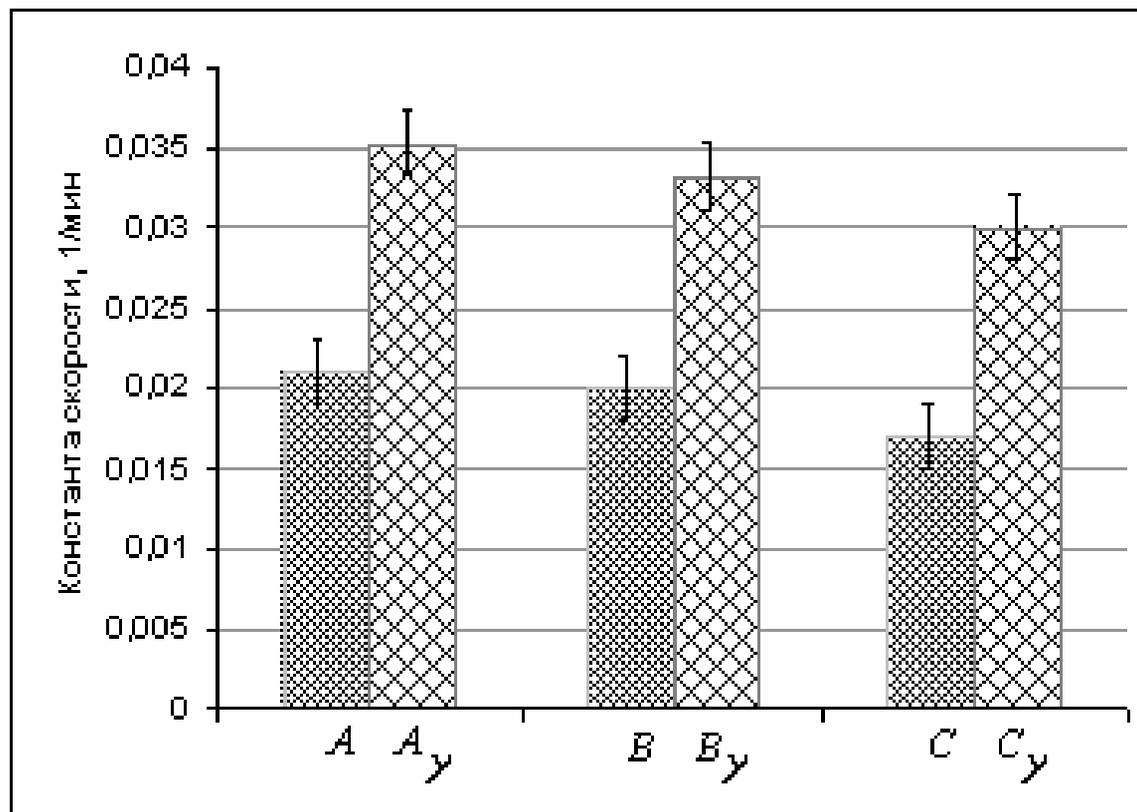
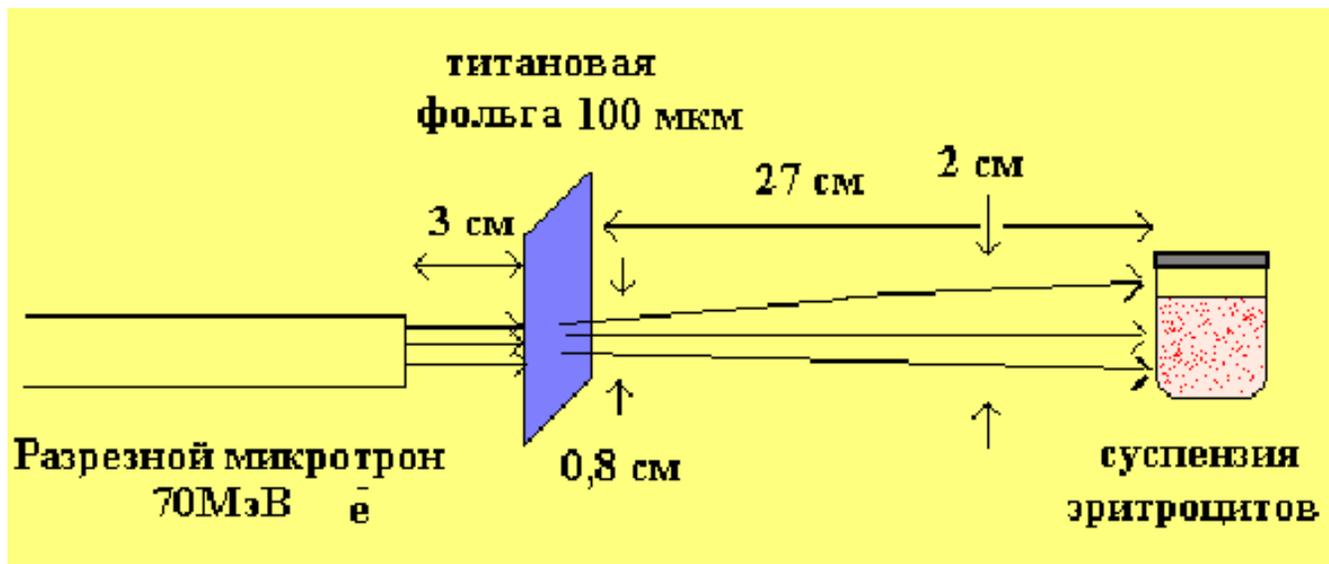


Схема облучения суспензии эритроцитов пучком ускоренных электронов



Параметры пучка при энергии электронов 40 МэВ: ток в импульсе $I=(0.7-1)$ мА, средний ток $I_{\text{ср.}}=(0,02-0,05)$ мкА, длительность импульса $\tau=4-5$ мкс, частота следования импульсов $f=10$ Гц

Ускорители электронов – разрезной микротрон (НИИЯФ им. Д.И. Скобельцына МГУ)

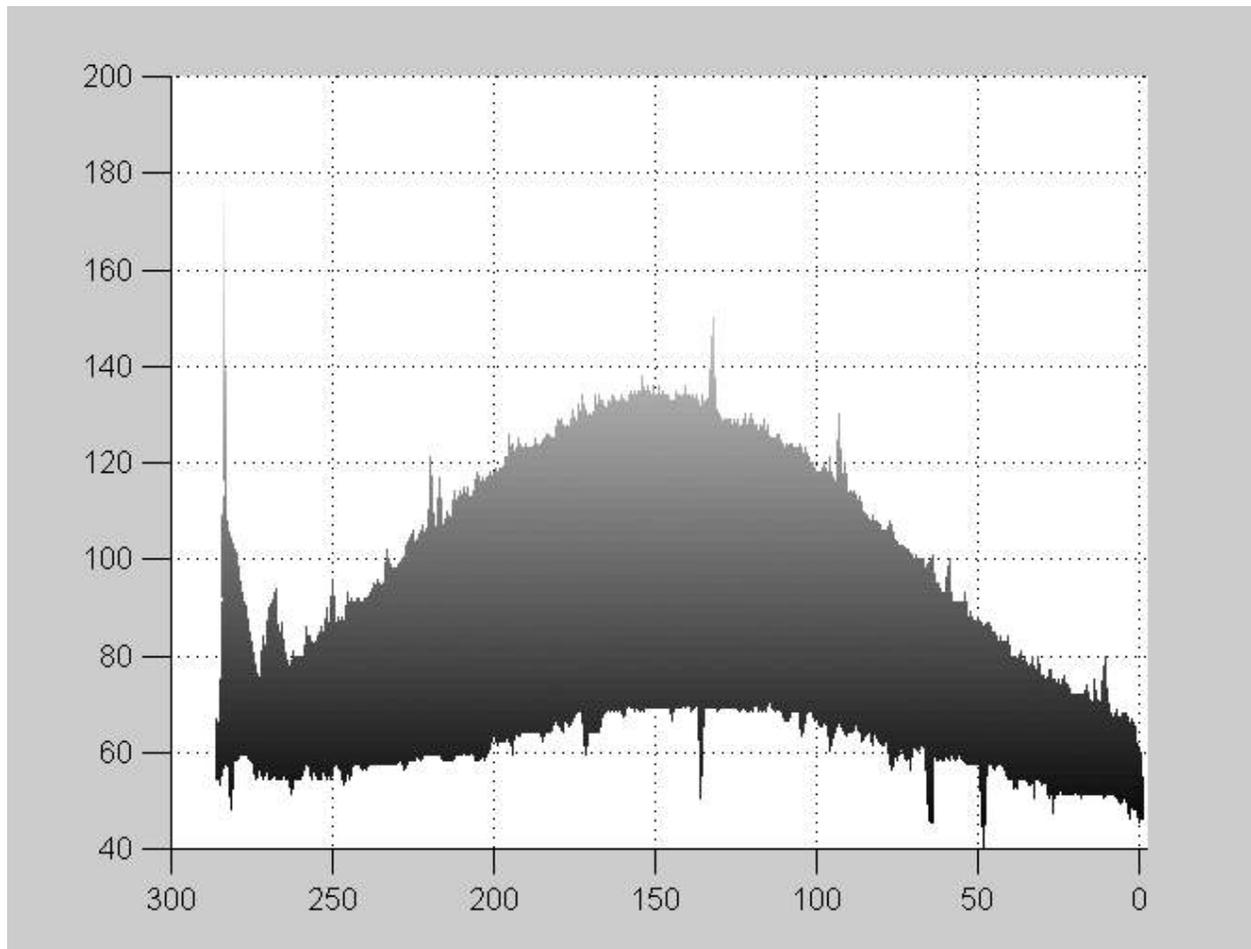
Разрезной микротрон

и

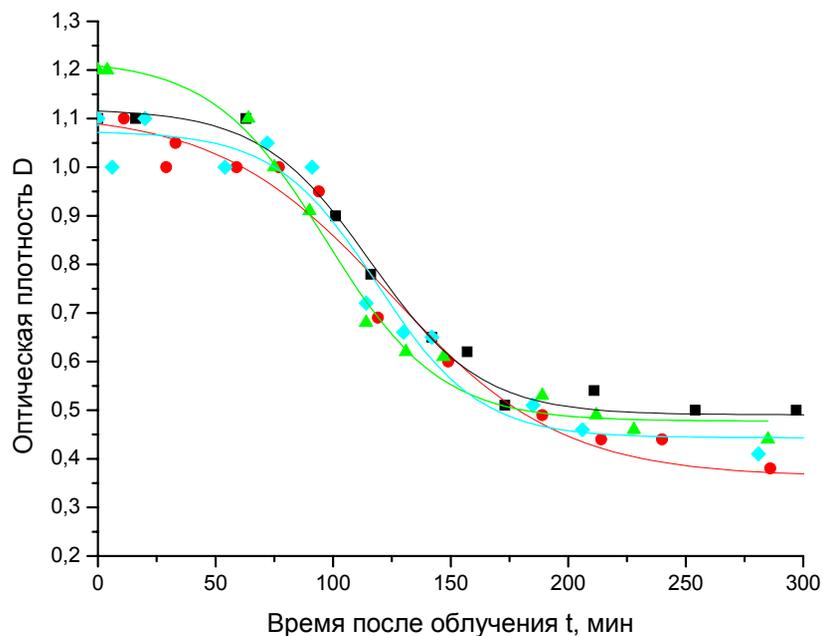
Линейный ускоритель



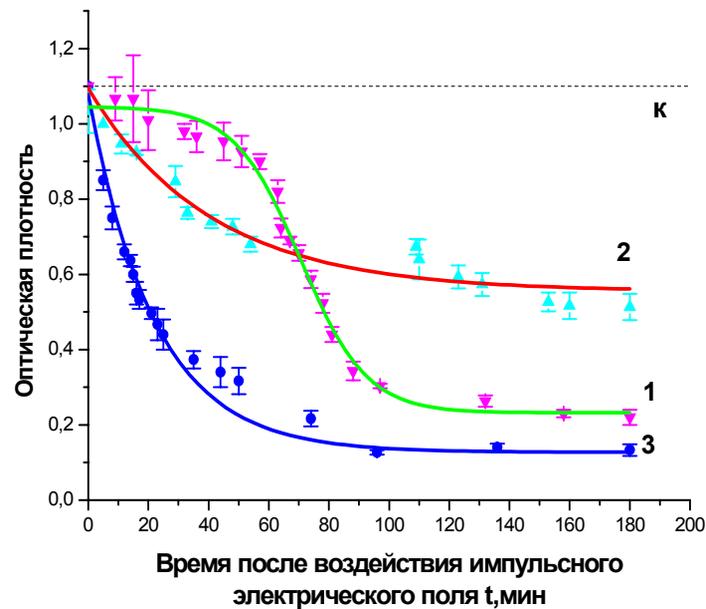
Распределение дозы в пучке: по оси y отложена доза облучения в отн. ед.; по оси x – расстояние от центра пучка (100 ед. = 1,3 см)



Кинетические кривые в результате воздействия пучка ускоренных электронов на суспензию эритроцитов. Доза 6930 Гр (для всех кривых средний ток пучка 0,9 мА, время облучения 4 мин)



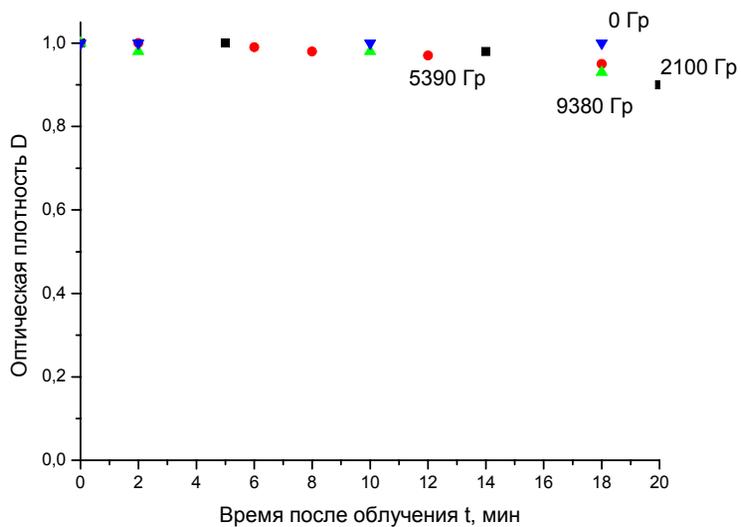
Кинетические кривые $D(t)$ уменьшения числа клеток в результате действия пучка ускоренных электронов (1), импульсного электрического поля (2) и их комбинированного действия (3) и на суспензию эритроцитов. Доза 7700 Гр (энергия электронов $E=40$ МэВ, средний ток пучка $I=1$ мА, время облучения 4 минуты), напряженность поля в растворе 1700 В/см



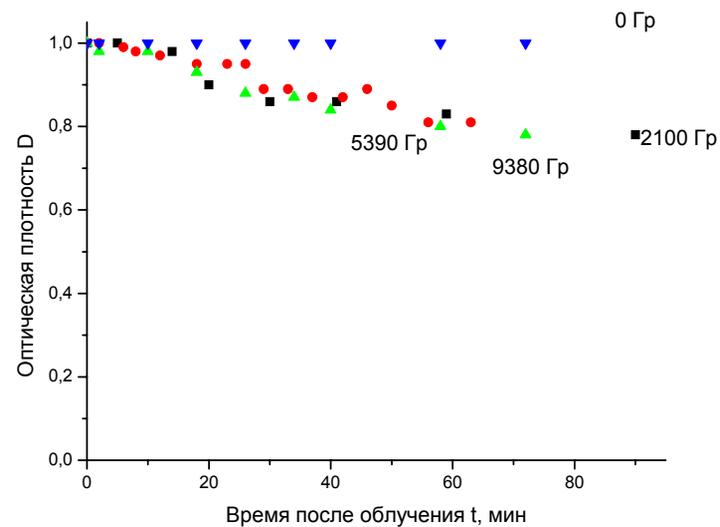
$$\beta_{\gamma+E} > \beta_{\gamma} + \beta_E$$

Оптическая плотность в зависимости от времени после облучения суспензии для разных доз: а) время наблюдения 20 мин, б) время наблюдения 90 мин

а



б



Кинетические кривые изменения оптической плотности от времени в результате комбинированного действия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля на суспензию эритроцитов,

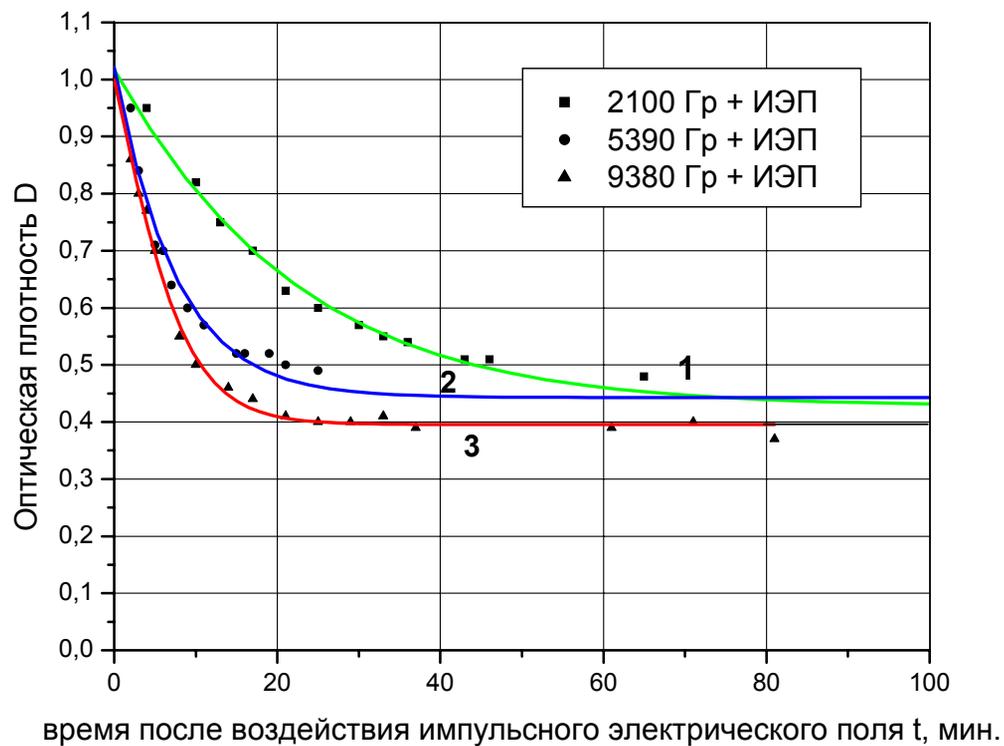
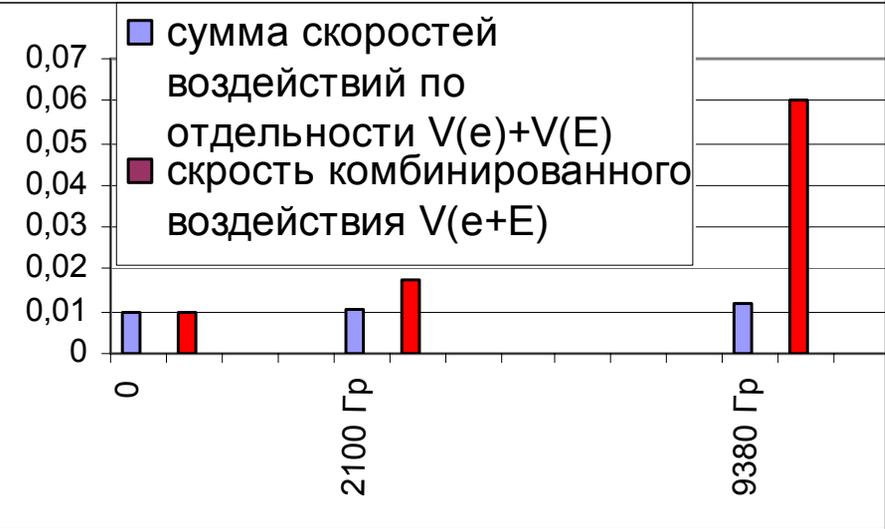


Диаграмма скоростей гемолиза: а) при комбинированном воздействии пучком ускоренных электронов и калиброванным ИЭП для разных доз б) при воздействии только пучком ускоренных электронов, $E=1700$ В/см

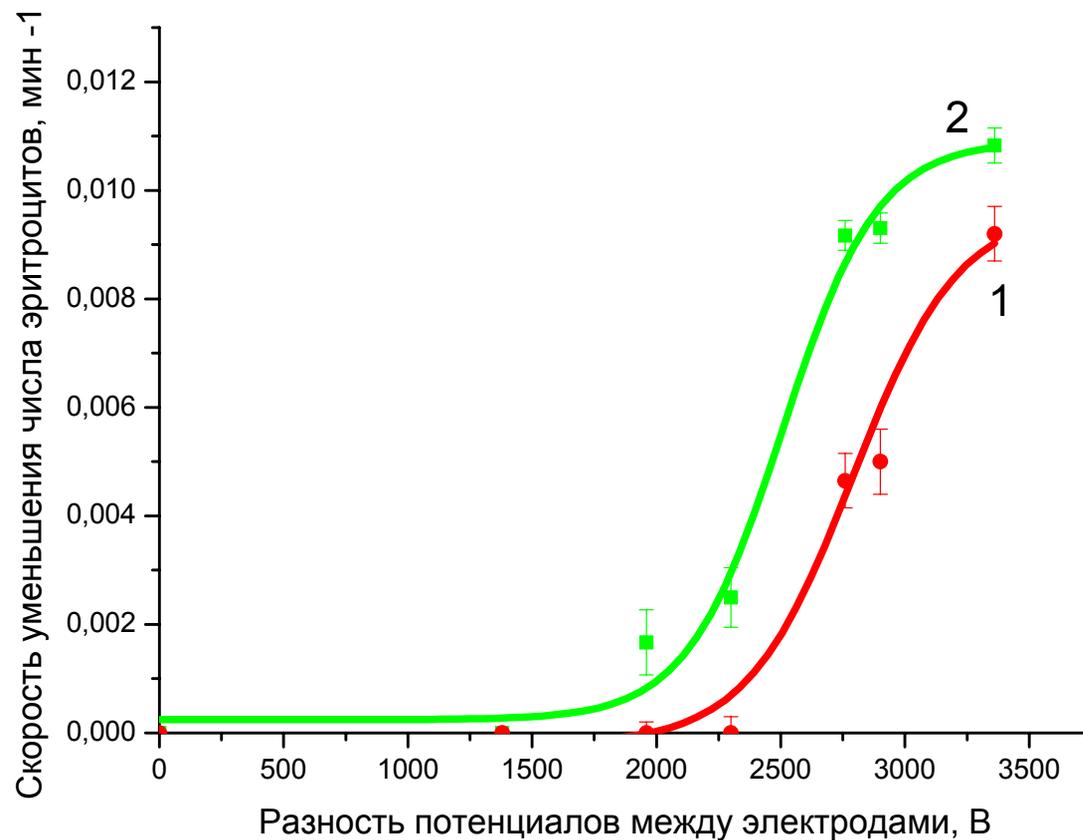


T0,5 29 мин 17 мин 5 мин

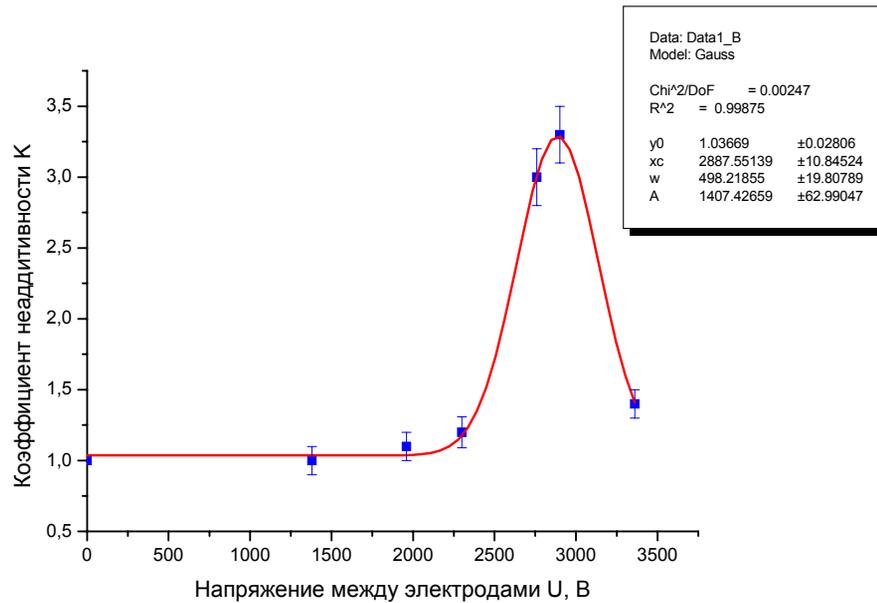


T0,5 9 суток 5 суток 0,5 суток

Изменение порогового напряжения электрического пробоя мембраны эритроцитов в результате воздействия ионизирующего излучения на суспензию



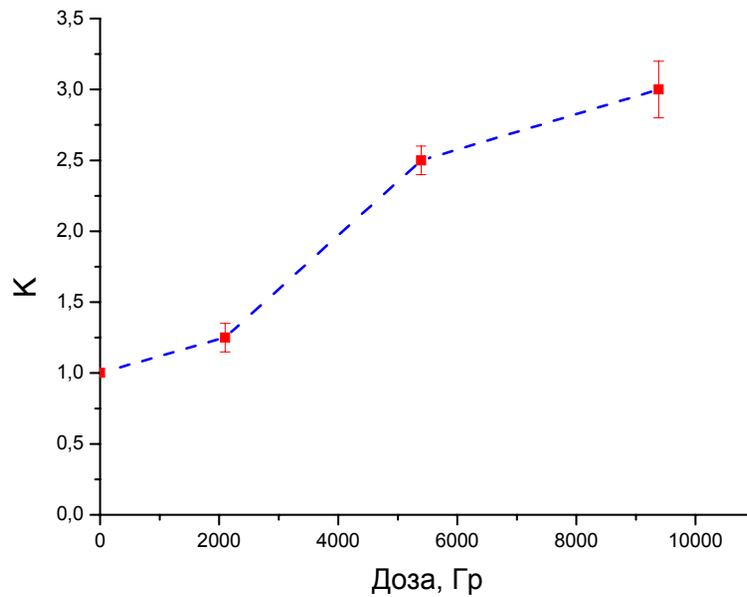
Коэффициент неаддитивности $K = \frac{\beta_{e+E}}{\beta_e + \beta_E}$ в зависимости от напряжения между электродами. Сглаживание произведено с помощью кривой нормального закона распределения. D=7700 Гр



Коэффициент неаддитивности

в зависимости от
напряжения между электродами, $E=1700$ В/см

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

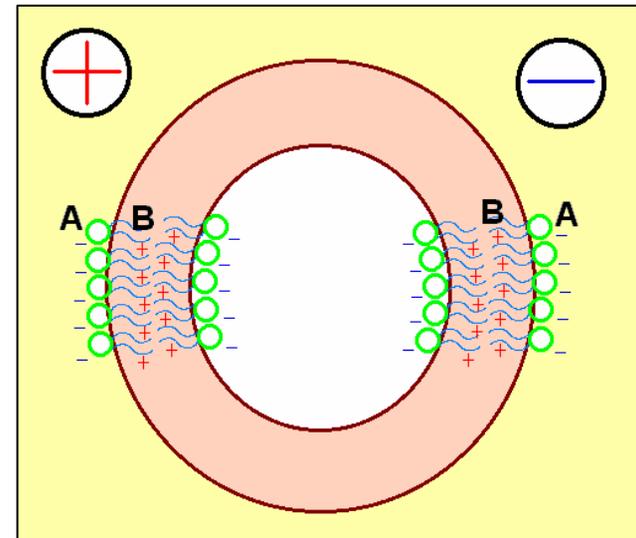
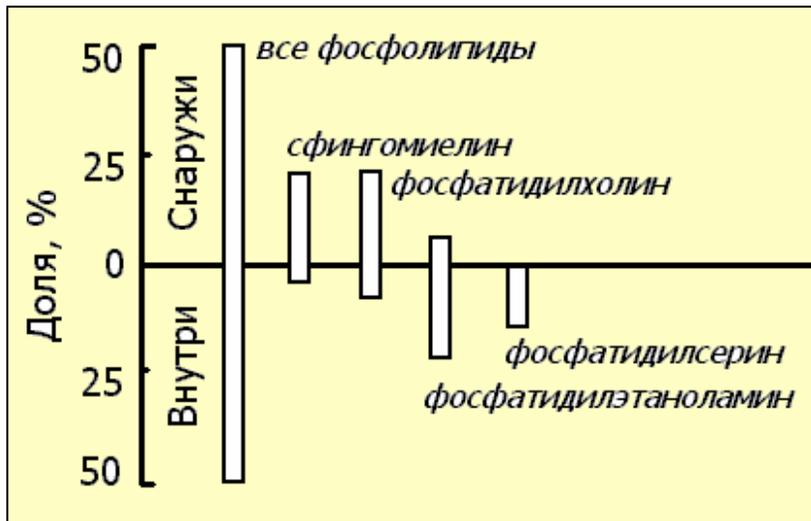
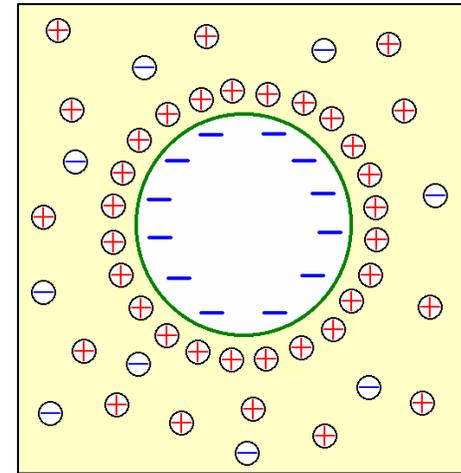


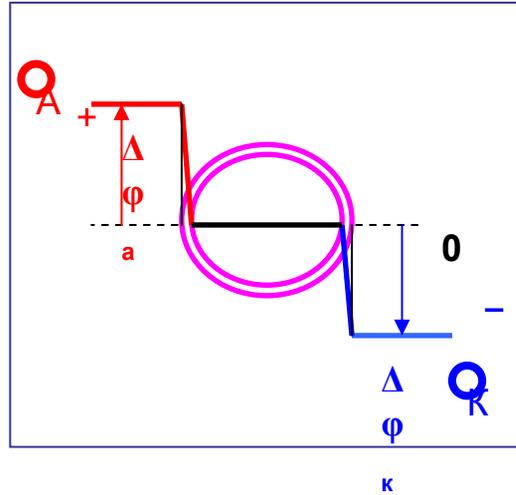
Неоднородности в биологической мембране

«дефекты» на границе двух «сред»

ионные каналы
аквапоры
белок – липид

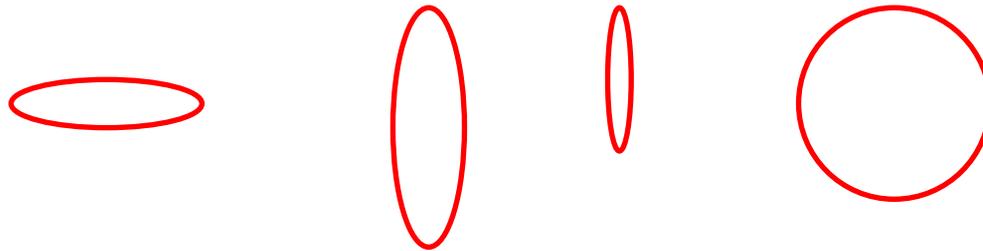
+



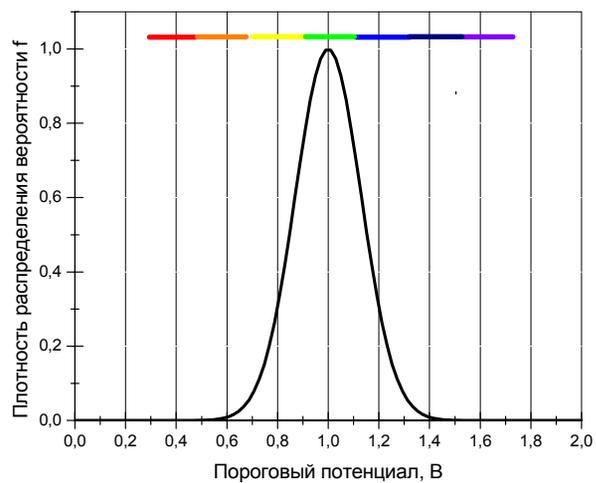
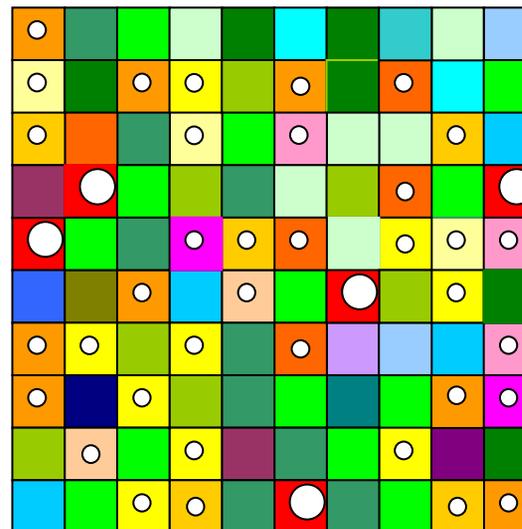
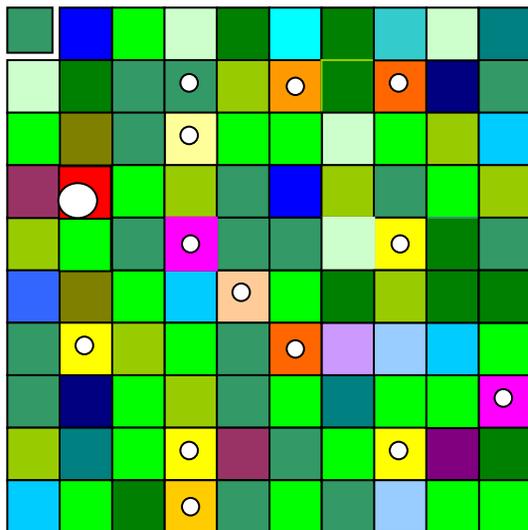


Наведенный трансмембранный потенциал:

$$\Delta\varphi = kd$$



Участки мембраны с разными пороговыми потенциалами



$$V_{nop} = \sqrt{\frac{\pi\gamma^2 - \sigma_s W^*}{\alpha W^*}}$$

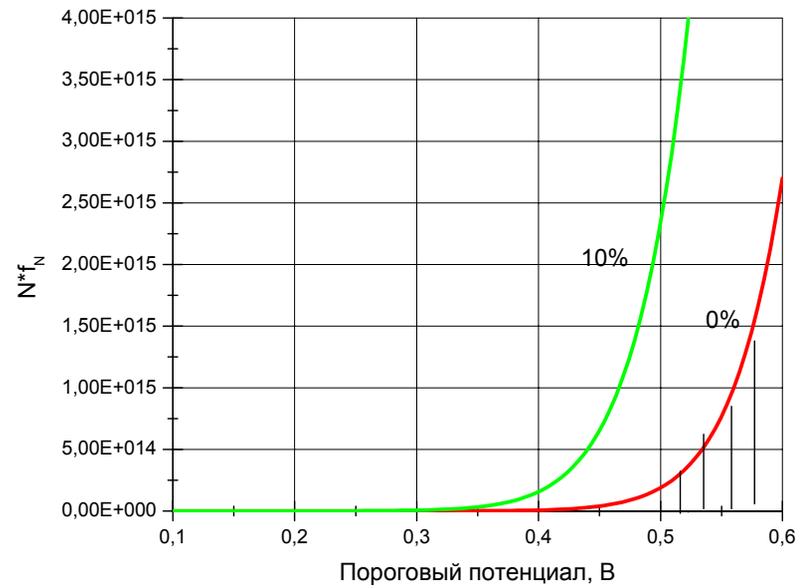
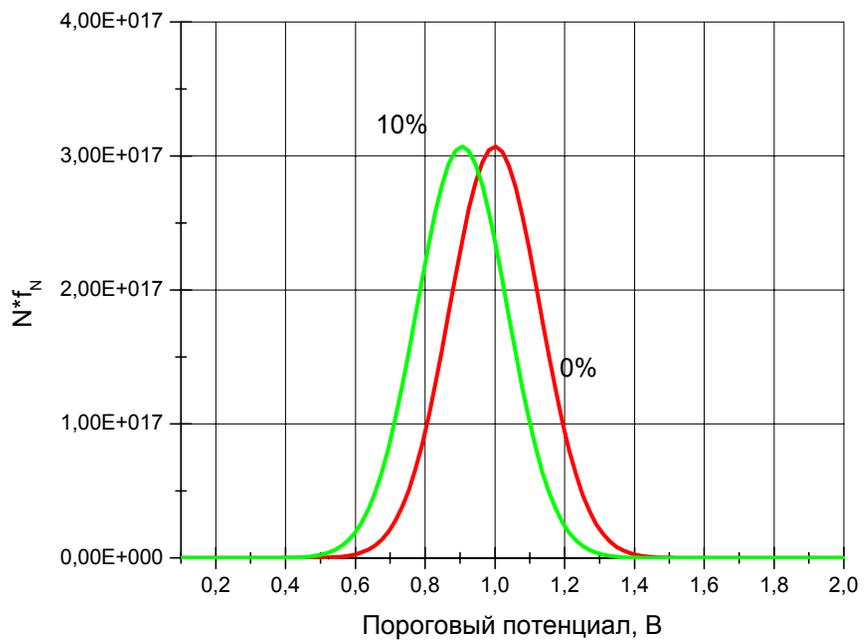
$$\lim_{N \rightarrow \infty} (dN / N) = f_N (V_{пор}, t) dV_{пор}$$

$$N \rightarrow \infty$$

$$f_N = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(V_{пор} - V_{ср пор})^2}{2\sigma^2}\right)$$

$$dN = \frac{N}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left(-\frac{(V_{пор} - V_{ср пор})^2}{2\sigma^2}\right) dV_{пор}$$

$$S = \frac{N}{\sigma\sqrt{2\pi}} \int_{V_{min}}^V \exp\left(-\frac{(V_{пор} - V_{ср пор})^2}{2\sigma^2}\right) \pi \left(\frac{k}{V_{пор}}\right) dV_{пор}$$



Электроны. Ионизационные потери

$$\frac{(-dE/dx)_{\text{рад}}}{(-dE/dx)_{\text{иониз}}} \approx \frac{zE(\text{МэВ})}{800}$$

$$E_{\text{кр}} \approx 100 \text{ МэВ}$$

$$-\left(\frac{dE}{dx}\right) \approx \frac{2\pi e^4 n_e}{m_e v^2} \left(\ln \frac{m_e v^2 E}{2I^2 (1-\beta^2)} - \left(2\sqrt{1-\beta^2} - 1 + \beta^2\right) \ln 2 + 1 - \beta^2 + \frac{1}{8} \left(1 - \sqrt{1-\beta^2}\right)^2 \right) \frac{\partial B}{\text{см}},$$

Прохождение пучка электронов через титановую фольгу, стекло колбы и суспензию



$$-\left(\frac{dE}{dx}\right) \approx \frac{2\pi e^4 n_e}{m_e v^2} \left(\ln \frac{m_e v^2 E}{2I^2(1-\beta^2)} - (2\sqrt{1-\beta^2} - 1 + \beta^2) \ln 2 + \frac{1}{8} (1 - \sqrt{1-\beta^2})^2 \right) \frac{\text{эВ}}{\text{см}},$$

$$\Delta E = -\left(\frac{dE}{dx}\right) \cdot l(\text{см}).$$

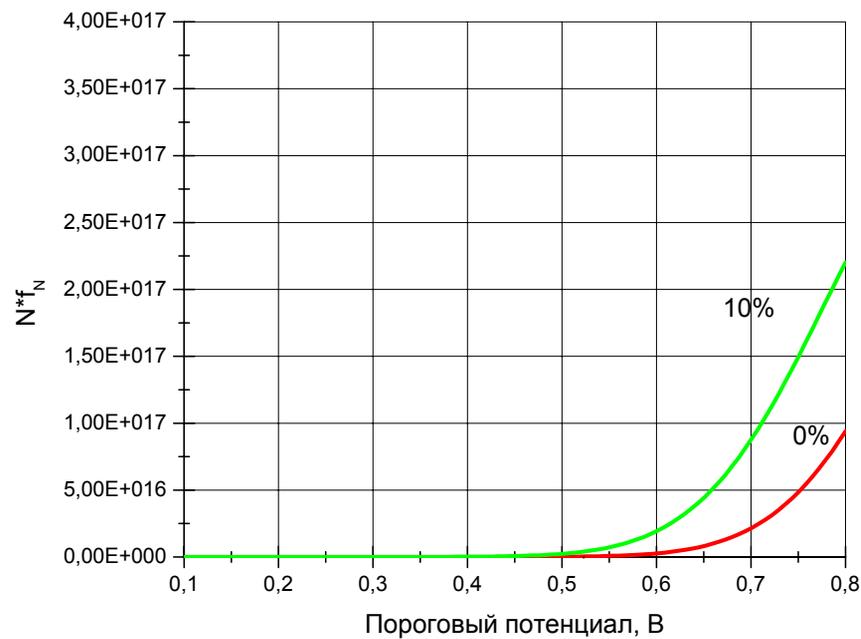
$$\Delta E_{\text{титан}} = -\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{титан}} \cdot l \approx 580 \text{кэВ}. \quad \Delta E_{\text{стекло}} = -\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{стекло}} \cdot l \approx 4,8 \text{МэВ}. \quad \Delta E_{\text{вода}} = -\left(\frac{dE}{dx}\right)_{\text{вода}} \cdot l \approx 4 \text{МэВ}.$$

$$P = \frac{\Delta E \cdot N_{\bar{e}}}{m_{\text{суспензии}}} \cdot f = \frac{4 \cdot 10^6 \text{эВ} \cdot 1,6 \cdot 10^{-19} \text{ Кл} \cdot 1 \text{В} \cdot 3 \cdot 10^{10} \text{ электронов} \cdot 10 \text{Гц}}{6 \cdot 10^{-3} \text{ кг}} = 32 \text{Гр} / \text{сек}.$$

Оценка поглощенной дозы облучения

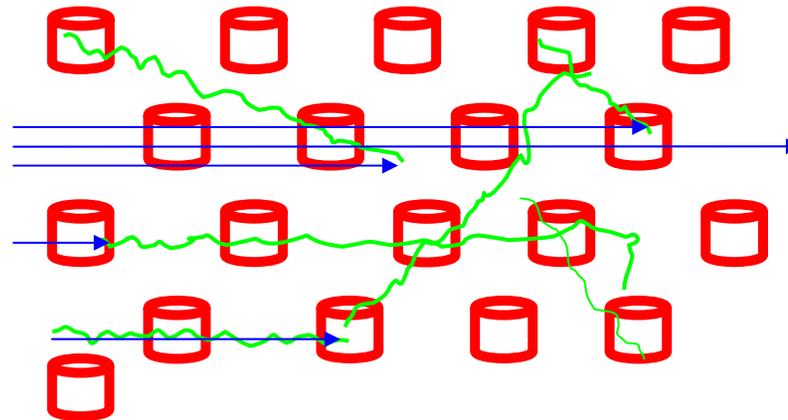
<i>t</i> обл., мин.	1,5	4	7
<i>D</i> , Гр	3000	7700	13400

Изменение среднего порога электрического пробоя



γ -излучение. Оценка воздействия вторичных электронов на биологические мембраны

- Решение задачи разделено на следующие этапы.
- Расчет изменения интенсивности γ -излучения в суспензии.
- Анализ пространственного распределения вторичных электронов.
- Расчет статистического веса электронов с разной энергией.
- Расчет ионизационных потерь в зависимости от энергии электронов.
- Оценка количества эритроцитов, охватываемых треком электрона заданной энергии.
- Расчет общего количества треков, пересекающих эритроцит.
- Оценка вероятности ионизации и возбуждения мембраны с учетом ее размеров и результатов
- Оценка минимального времени облучения для возникновения 1 акта ионизации и 1 акта возбуждения в мембране каждого эритроцита.
- Оценка изменения скорости гемолиза эритроцитов за счет появления активных центров электропорации в результате воздействия γ -излучения.



Активность $A = 9$ мКи

$$I_0 = 10^7 \text{ квант/см}^2$$

$$I = I_0 \exp(-\sigma n x)$$

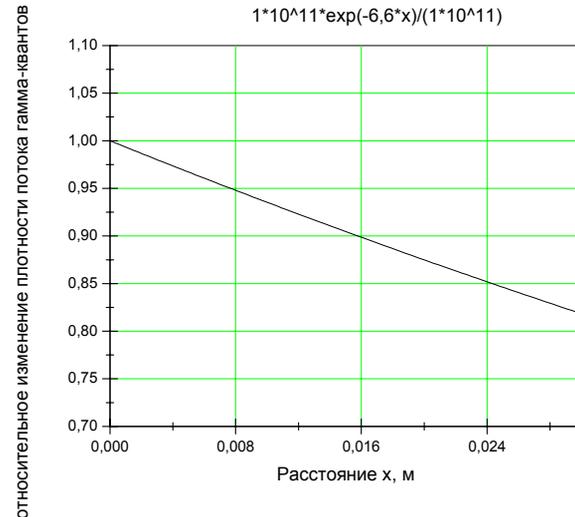
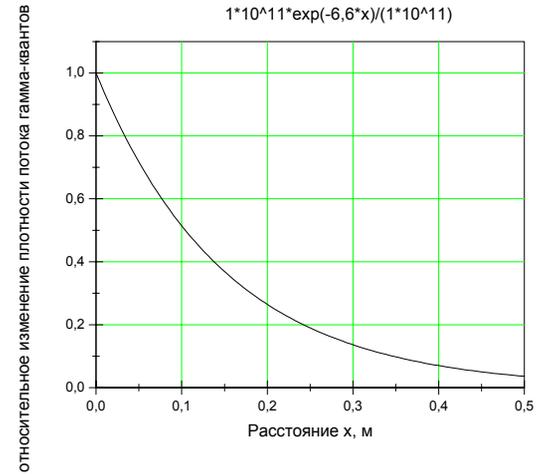
$$\mu = n\sigma = \rho N_A \frac{Z}{A} \sigma(\varepsilon)$$

$$\varepsilon = E_\gamma / m_e c^2 \quad \sigma = \pi r_e^2 \frac{1}{\varepsilon} \left(\frac{1}{2} + \ln 2\varepsilon \right) \quad \mu = 6,65 \text{ м}^{-1}$$

$$I = 10^7 \exp(-6,65x)$$

Изменение интенсивности γ -излучения на толщине мембраны эритроцита

$$dI = -\sigma n I l, \quad l_M = 15 \cdot 10^{-9} \text{ м.}$$



Число образовавшихся вторичных электронов равно числу γ -квантов, участвующих в комптон-эффекте :

$$N_{\gamma} = N_0 e$$

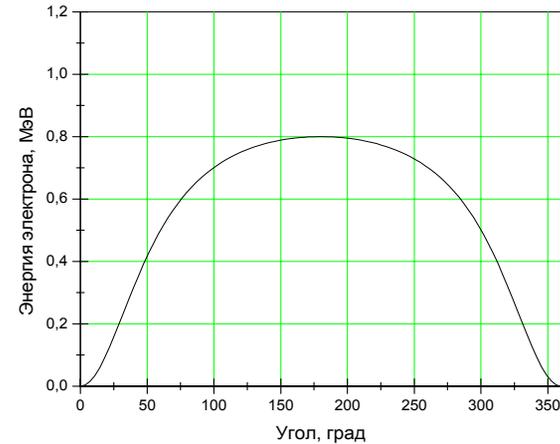
В прямом комптон-эффекте энергия рассеянного γ -кванта $E_{\gamma'}$ и электрона отдачи E_e в зависимости от угла :

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

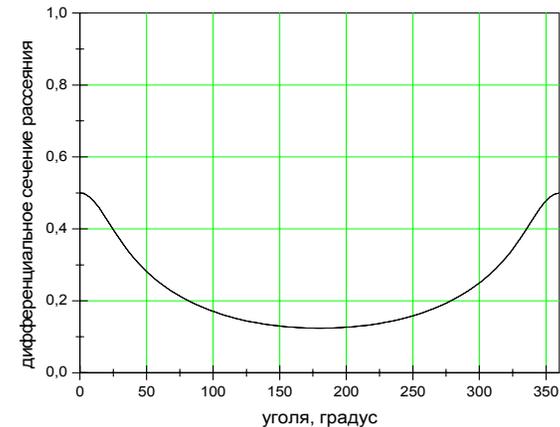
$$E_e = \frac{E_{\gamma}}{1 + mc^2 / E_{\gamma} (1 - \cos \theta)}$$

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

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



Зависимость энергии электрона от угла рассеяния , соответствующего ему γ -кванта



Зависимость

$$\frac{d\sigma_{\text{компн}}}{d\Omega}(\theta)$$

характерная длина трека:

$$l = \frac{E_e}{\frac{dE_e}{dx}} \quad \frac{dE_e}{dx}(E_e(\theta))$$

Средняя длина трека

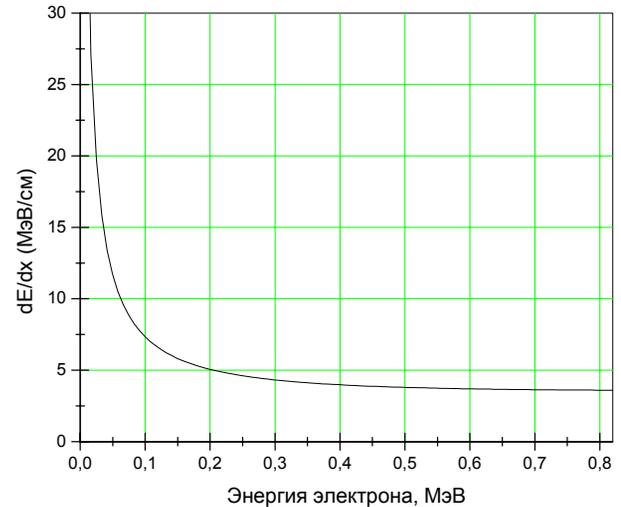
$$L = \frac{\int_0^{2\pi} \frac{d\sigma_{\text{компл}}}{d\Omega}(\theta) \frac{E_e(\theta)}{dE_e(\theta)/dx} d\theta}{\int_0^{2\pi} \frac{d\sigma_{\text{компл}}}{d\Omega}(\theta) d\theta}$$

$$E_\gamma = 1 \text{ МэВ} \quad L = 500 \text{ МКМ.}$$

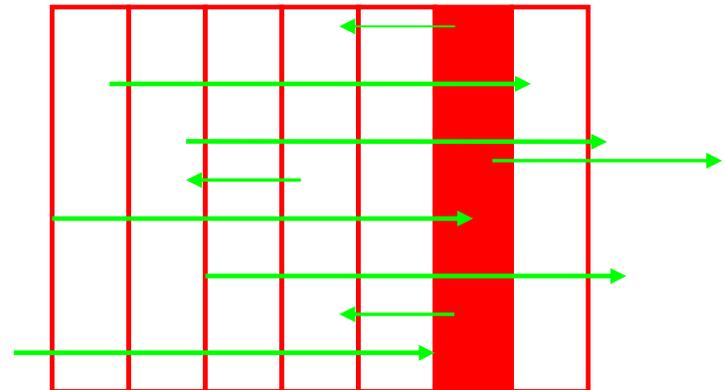
количество слоев, равных толщине мембраны будут охвачены 1 треком со средней длиной L :

$$N = L/l \text{ м,}$$

$$N = 500 * 10^{-6} / 15 * 10^{-9} = 3 * 10^4$$



Зависимость ионизационных потерь от энергии электрона

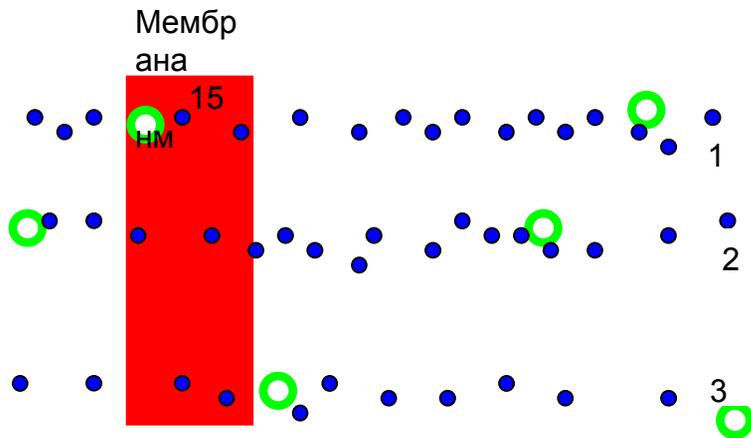


$$dI = -\sigma n I_m * L / l_m = -\sigma n I L,$$

$$dI = 20 * 10^7 \text{ квант/с} * \text{м}^2 \quad S_{\text{эр}} = 10^{-10} \text{ м}^2$$

t=50 с

каждый мембрана каждого эритроцита в суспензии будет пересечена в среднем одним треком



Схематичное представление: три трека, пересекающих мембрану (красным, толщина 10 нм). Синие кружки- возбуждение молекул (зеленые – ионизация (на расстоянии 150 нм))

Зарождение активных центров в мембране:

1-2 возбужденные молекулы - $t_{\text{мин возб}} = 1$

мин

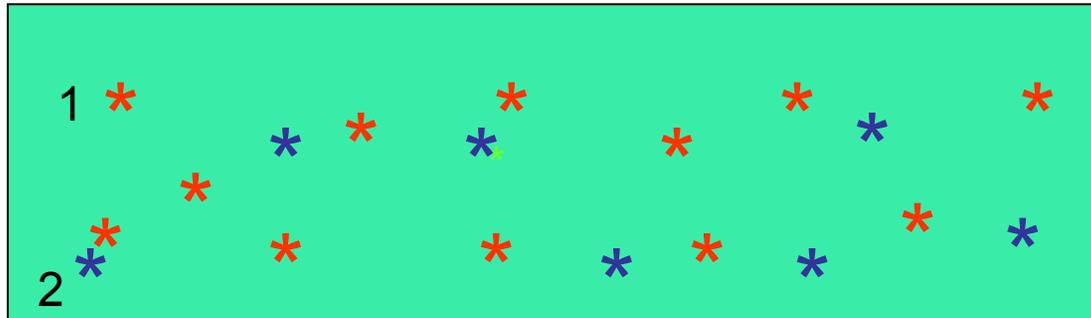
1 акт ионизации -

$t_{\text{мин иониз}} = 10$

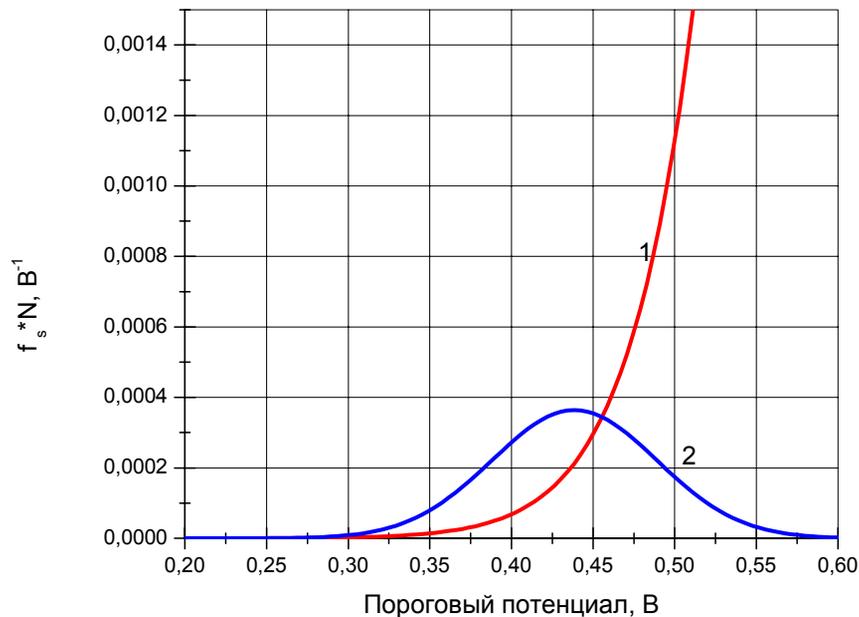
мин (Доза мин -

0,1 - 1 сГр

Два статистических ансамбля после облучения: 1 неповрежденные элементы, 2 – ансамбль активных центров в результате γ -излучения



$$V_{\gamma} / N = (S_{\gamma} + S) / S$$



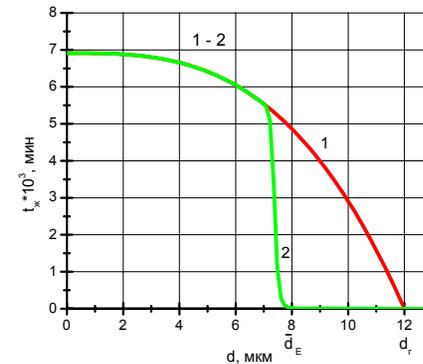
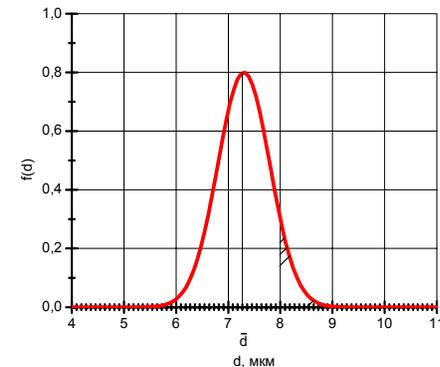
Математическое описание изменения числа эритроцитов в суспензии в результате воздействия физических факторов

- Время жизни эритроцита - время, в течение которого эритроцит существует в суспензии с момента ее создания до его “лопания” в результате осмотического гемолиза

$$t_{жс} = \frac{V_2 - V}{q} = \frac{1/6 \pi (d_2^3 - d^3)}{q}$$

- Всего в данный момент времени согласно закону нормального распределения в суспензии будет находиться эритроцитов с данным диаметром

$$N = N_0 F(d) = N_0 \frac{1}{\sigma \sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^d \exp\left(-\frac{(d - \bar{d})^2}{2\sigma^2}\right) dr = N_0 \operatorname{erf}\left(\frac{d - \bar{d}}{\sqrt{2}\sigma}\right)$$



1. Воздействие пучком ускоренных электронов

Скорость изменения объема эритроцита, определяемая характерным временем нарушения структуры, ионного обмена, осмоса воды в условиях воздействия пучком ускоренных электронов, равна

$$q_e = q_0 + a\phi_e(d) = q_0 + a\left(1 - \exp\left(-\frac{kd^2}{d_2^2}\right)\right)$$

Время жизни каждого эритроцита данного диаметра

$$t_{жс} = \frac{\frac{1}{6}\pi(d_2^3 - d^3)}{q_e} = \frac{\frac{1}{6}\pi(d_2^3 - d^3)}{q_0 + a\left(1 - \exp\left(-\frac{kd^2}{d_2^2}\right)\right)}$$

2. Воздействие импульсным электрическим полем

$$\Delta\varphi = \frac{3}{2} \frac{E \cos\theta}{d_E}$$

Наведенный трансмембранный потенциал:

Количество пор в мембране эритроцита диаметра d :

$$n_{пор} \sim \operatorname{erf}\left(\frac{d - \bar{d}_E}{\sigma_E}\right)$$

зависит от трансмембранного потенциала

В этом случае скорость изменения объема выражается как

$$q_E = q_0 + b\phi_E(d) = q_0 + b \operatorname{erf}\left(\frac{d - \bar{d}_E}{\sigma_E}\right)$$

При этом формула для времени жизни каждого эритроцита

данного диаметра от момента начала измерения до момента лопания будет выглядеть как

$$t_{жс} = \frac{\frac{1}{6}\pi(d_2^3 - d^3)}{q_E} = \frac{\frac{1}{6}\pi(d_2^3 - d^3)}{q_0 + b \operatorname{erf}\left(\frac{d - \bar{d}_E}{\sigma_E}\right)}$$

3. Комбинированное действие пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля

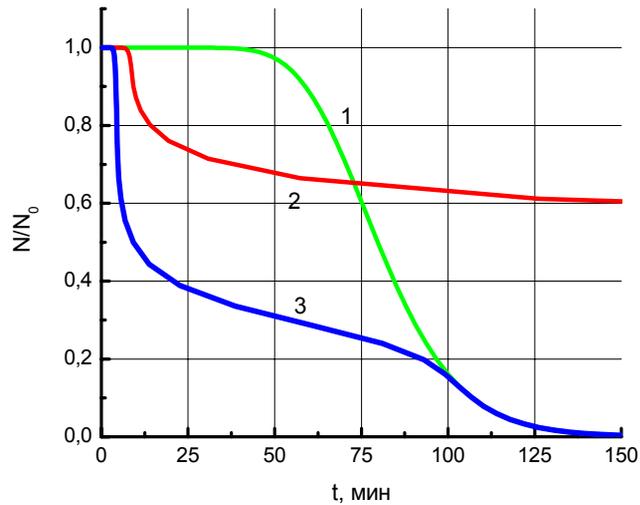
Скорость изменения объема эритроцита, определяемая характерным временем нарушения структуры, ионного обмена и осмоса воды, в случае комбинированного воздействия будет определяться как

$$q_{e+E} = q_0 + a \left(1 - \exp \left(-\frac{kd^2}{d_z^2} \right) \right) + \operatorname{berf} \left(\frac{d - \bar{d}'_E}{\sigma_E} \right)$$

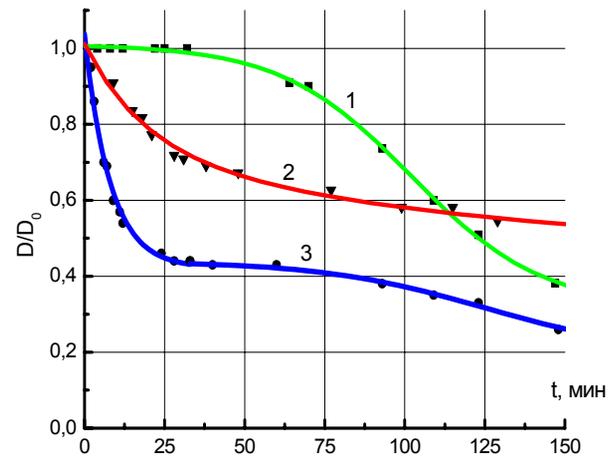
Время жизни каждого эритроцита данного диаметра от момента начала измерения до момента лопания

$$t_{ж} = \frac{\frac{1}{6} \pi (d_z^3 - d^3)}{q_0 + a \left(1 - \exp \left(-\frac{kd^2}{d_z^2} \right) \right) + \operatorname{berf} \left(\frac{d - \bar{d}'_E}{\sigma_E} \right)}$$

Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов и импульсным электрическим полем: 1 – кривая гибели эритроцитов в результате облучения e^- , 2 - кривая гибели эритроцитов в результате воздействия импульсным электрическим полем, 3 – кривая гибели эритроцитов в результате комбинированного воздействия; а) теоретические кинетические кривые) экспериментальные кинетические кривые (время воздействия e^- 4 мин, ток пучка $I=0,8\text{мА}$, $E=1700\text{ В/см}$, температура $T=20\text{С}$)



а



б

В основу модели положено представление о биологической мембране как о статистическом ансамбле ее участков с различными пороговыми потенциалами электрического пробоя. Воздействие физико-химических факторов приводит к изменению статистических параметров исходного ансамбля.

Математическая модель

позволяет на основе полученных экспериментальных кинетических кривых решить обратные задачи вычисления собственных параметров системы:

оценить изменение порогового напряжения электрического пробоя в результате воздействия пучка ускоренных электронов и γ -квантов, количество пор и их радиус на разных сторонах клетки, уменьшение величины поверхностного заряда эритроцита в результате действия γ -излучения

Диапазон доз излучения

D_{min} - зарождение минимального
числа активных центров в мембране

D_{min} теор = 0, 1 – 1 сГр

D_{min} экспер=0,5 сГр

D_{max} –

D_{max}=10000Гр

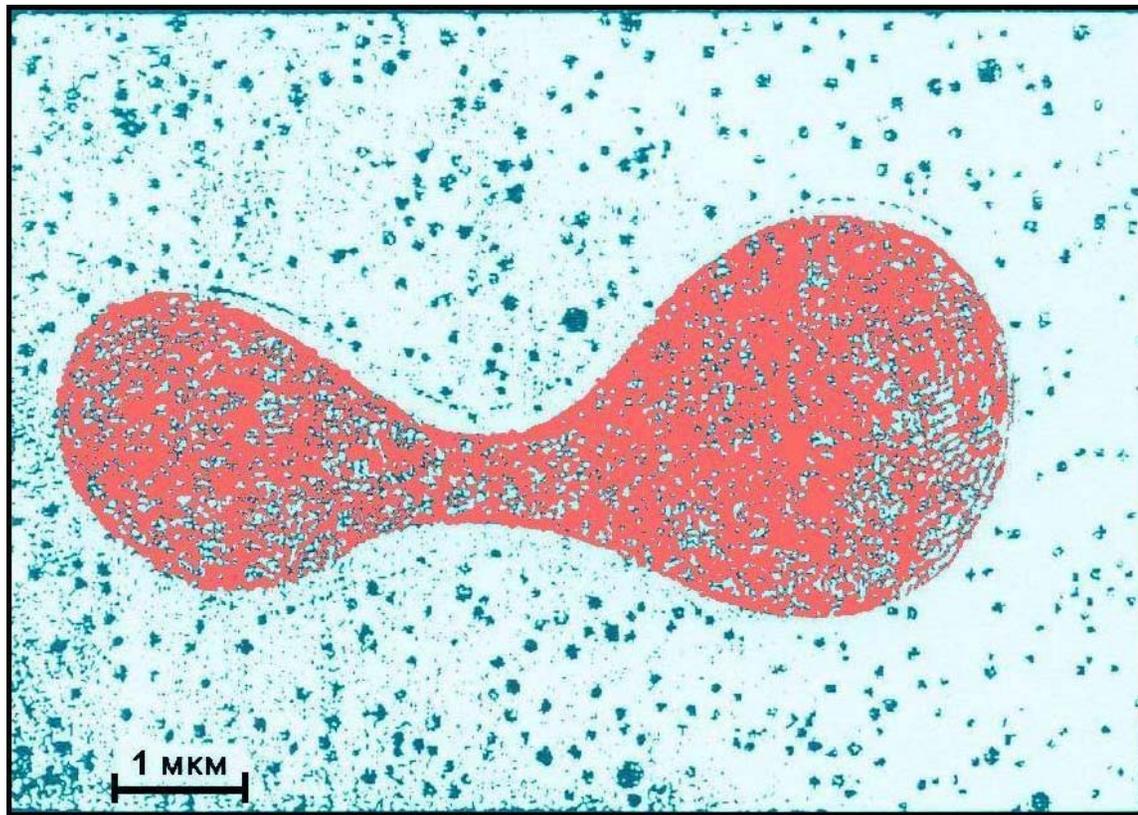
$\beta_{\text{гемоллиз}}$
после
облучения

$\ll \beta_{\text{гемоллиз}}$
после
импульсного
электрополя

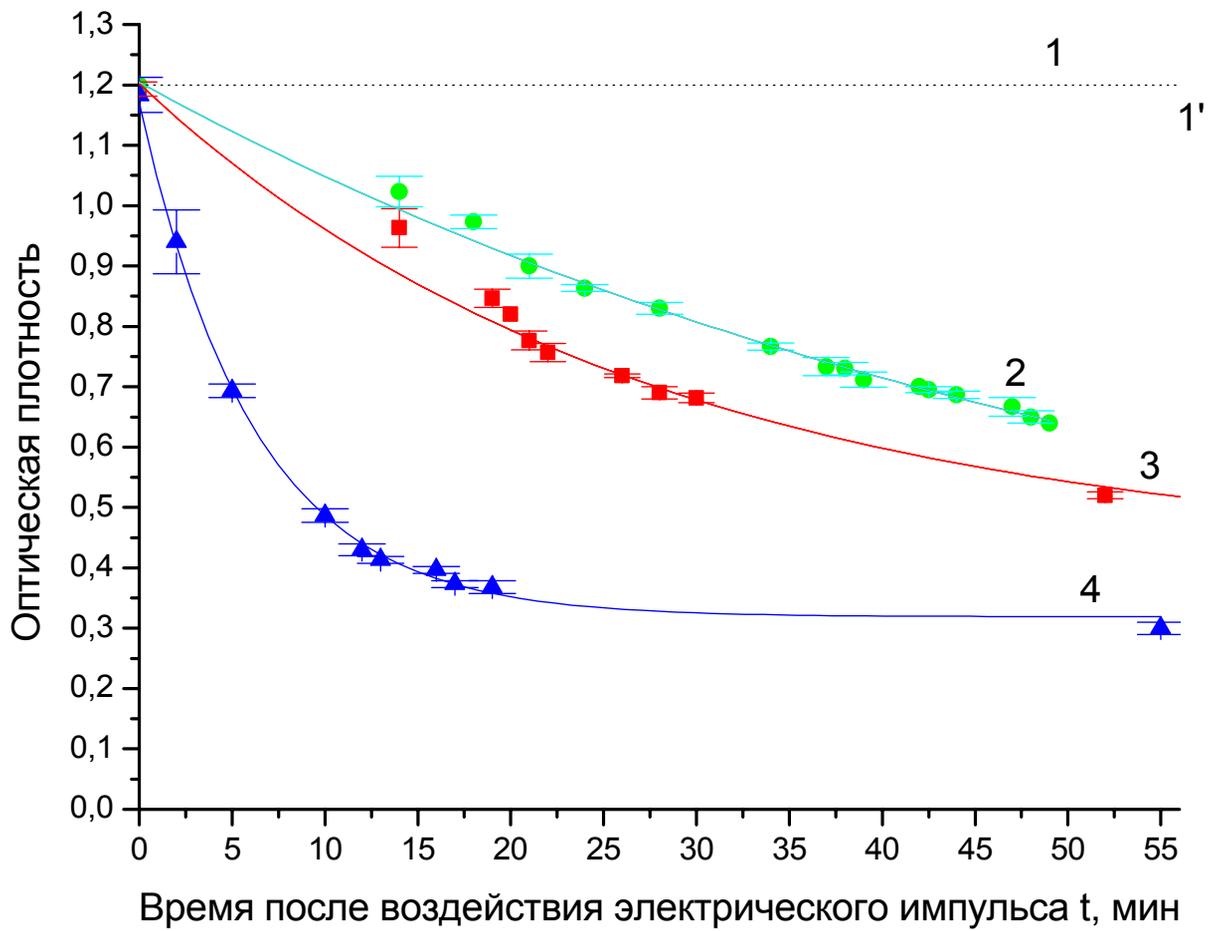
Универсальность метода

- 1. Действие фармакохимических препаратов на мембрану (на примере перфторана и ПАВ)
- 2. Различие действия на мембрану импульсов разной полярности
- 3. Различие состояний мембран для людей разных возрастных групп

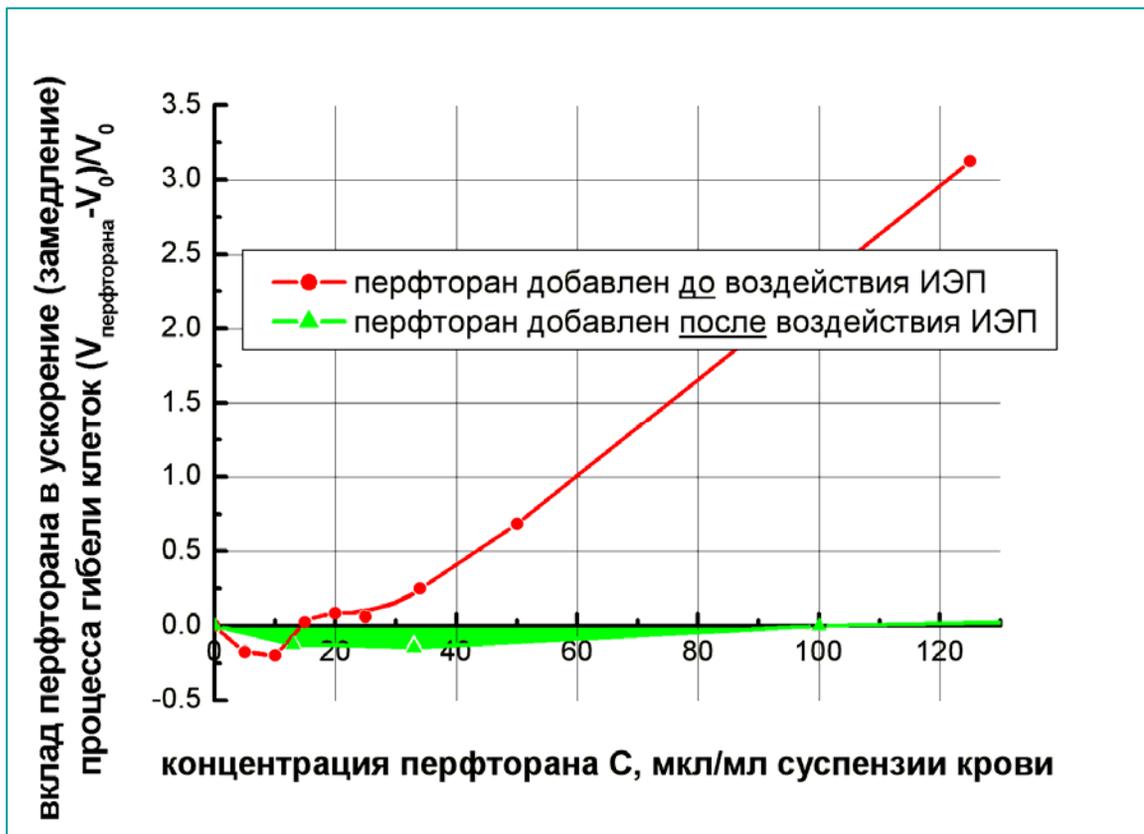
Соотношение размеров частичек эмульсии ПФОС и эритроцита



(рисунок сделан на основе электронно-микроскопического снимка, полученного с использованием метода криоскальвания) /из статьи Г.Р. Иваницкого/



Сравнение относительных скоростей уменьшения числа эритроцитов при добавлении перфторана до и после воздействия импульсным электрическим полем



1+
^

первый импульс

1+ 2+
^ ^

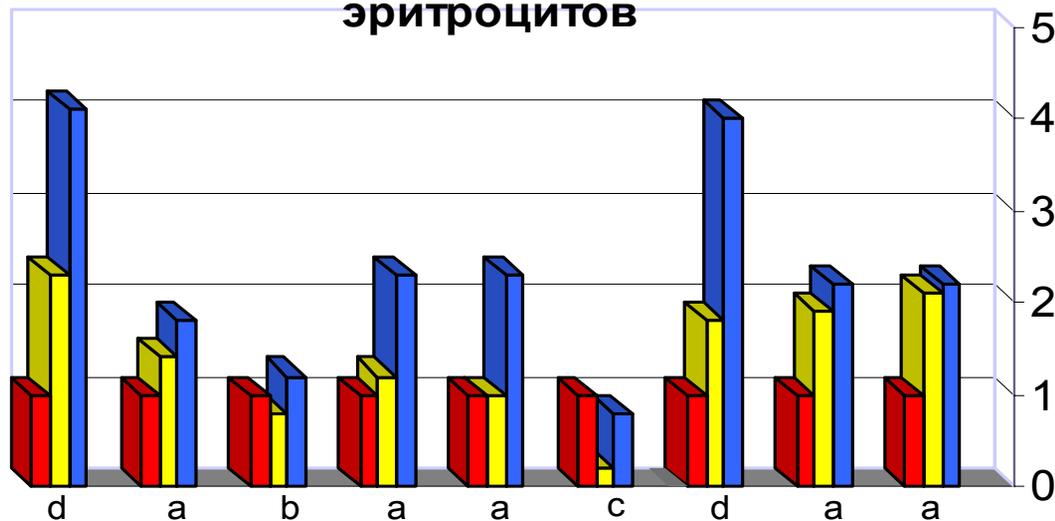
первый второй

той же полярности

1+ 2-
^ v

первый второй другой полярности

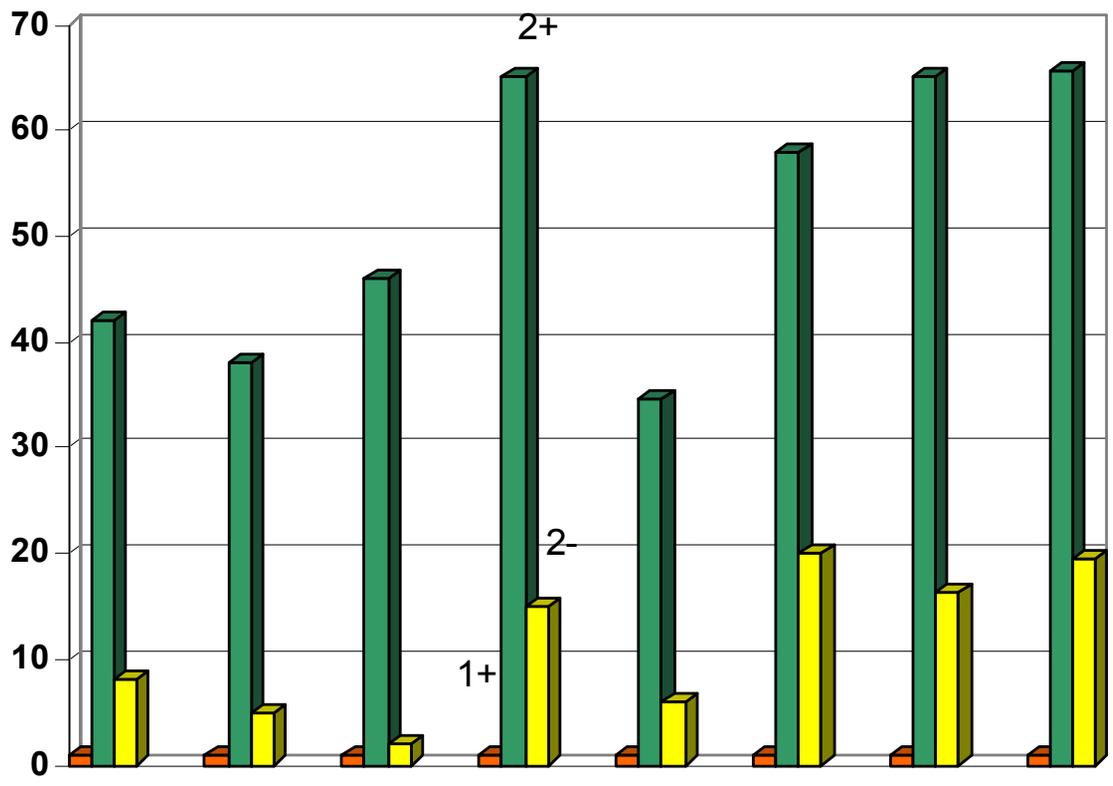
Относительная скорость уменьшения числа эритроцитов



■ первый импульс 1+ ■ второй импульс 2+ ■ второй импульс 2-

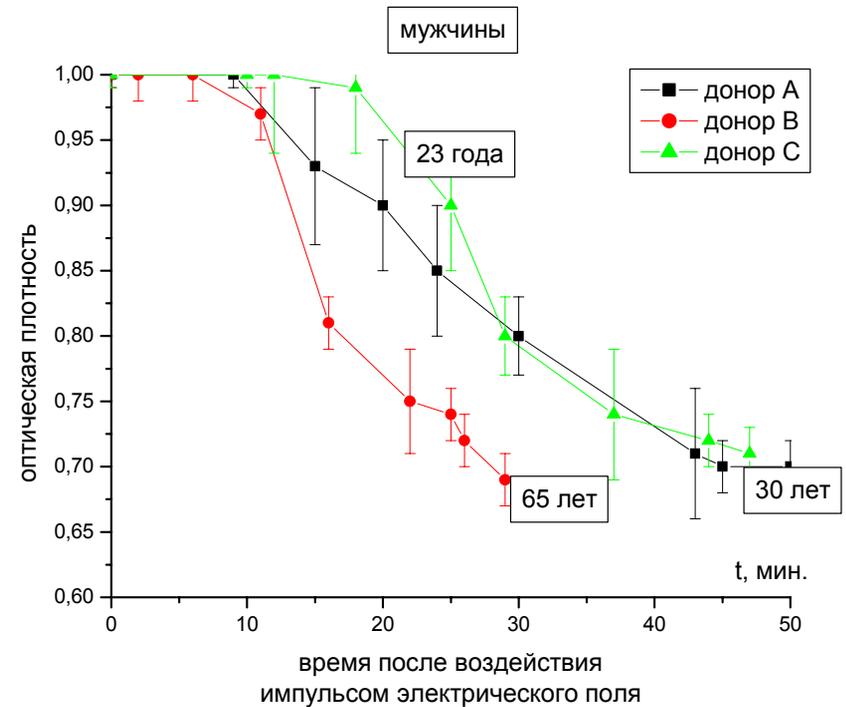
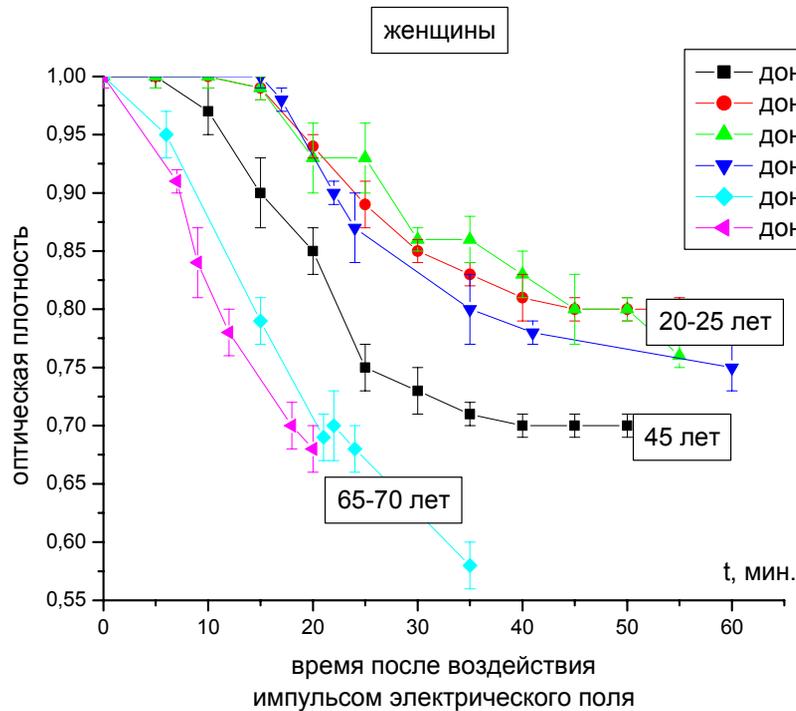
**относительная скорость
уменьшения численности
эритроцитов в суспензии крови
с добавлением ПАВ**

первый импульс 1+ второй импульс 2+ второй импульс 2-



Кинетические кривые зависимости уменьшения количества эритроцитов со временем после воздействия импульсом

электрического поля для суспензий крови женщин (а) и мужчин (б)



Выводы

1. Способ оценки воздействия пучка ускоренных электронов, γ -квантов и других физико-химических факторов на биологические мембраны с помощью импульсного электрического поля.
2. Способ оценки степени воздействия ионизирующего излучения и других физико-химических факторов, основанный на измерении числа клеток в результате последующей электропорации (кинетические кривые) и анализе мгновенной скорости их изменения. Диапазон исследования действия излучения 0,005 -10000 Гр.
3. Экспериментально установлены параметры биологической модели - суспензии эритроцитов- и рабочие характеристики метода калиброванной электропорации мембран эритроцитов (напряженность электрического поля, длительность и форма электрического импульса, температура, концентрация суспензии клеток и др.).
4. Экспериментально показано, что мгновенная скорость уменьшения числа клеток в результате комбинированного воздействия ионизирующего излучения и импульсного электрического поля не является суммой скоростей при действии этих же факторов по отдельности. Методом калиброванной электропорации экспериментально показано изменение диэлектрических свойств мембран эритроцитов через 5-30 мин после воздействия:
 - а) малых доз γ -излучения (0,5 - 5 сГр),
 - б) больших доз пучка ускоренных электронов (2000 -10000 Гр).
5. Математическая модель, которая позволяет на основе полученных экспериментальных кинетических кривых решить обратные задачи вычисления собственных параметров системы: оценить изменение порогового напряжения электрического пробоя в результате воздействия пучка ускоренных электронов и γ -квантов, количество пор и их радиус на разных сторонах клетки, уменьшение величины поверхностного заряда эритроцита в результате действия γ -излучения. В основу модели положено представление о биологической мембране как о статистическом ансамбле ее участков с различными пороговыми потенциалами электрического пробоя. Воздействие физико-химических факторов приводит к изменению статистических параметров исходного ансамбля.
6. Впервые в прямом физическом эксперименте показано различие действия перфторуглеродных соединений разных концентраций (1-100 мкл/мл суспензии), различие действия на клетку электрического поля разных направлений, отличие состояния мембран для различных возрастных групп доноров.