

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
им. М.В. ЛОМОНОСОВА

НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ  
ФИЗИКИ им. Д.В. СКОБЕЛЬЦЫНА

Козлова Е.К., Черняев А.П., Шведун В.И.  
Черныш А.М., Фомина У.А., Шаракшанэ А.С.  
Алексеева П.Ю., Горбунов П.В., Ермаков А.Н.

**КОМБИНИРОВАННОЕ ДЕЙСТВИЕ ПУЧКА  
УСКОРЕННЫХ ЭЛЕКТРОНОВ И ИМПУЛЬСНОГО  
ЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ПОЛЯ НА БИОЛОГИЧЕСКУЮ  
МЕМБРАНУ**

Препринт НИИЯФ МГУ-2002-29/713

УДК 612.014.421.5

ББК 28.073

К63

E.K. Kozlova, A.P. Chernyaev, V.I. Shvedunov  
A.M. Chernysh, U.A. Fomina, A.S. Sharakshanae  
P.J. Alekseeva, P.V. Gorbunov, A.N. Ermakov  
E-mail address: [fomina2001@rambler.ru](mailto:fomina2001@rambler.ru)

The combined action of accelerated electron beam and impulse electrical field  
on biological membrane.

Preprint NPI MSU-2002-29/713

#### Abstract

Experimental results of combined action of accelerated electron beam and impulse electrical field on biological membrane are represented in this preprint.

Е.К. Козлова, А.П. Черняев, В.И. Шведун  
А.М. Черныш, У.А. Фомина, А.С. Шаракшанэ  
П.Ю. Алексеева, П.В. Горбунов, А.Н. Ермаков

Комбинированное действие пучка ускоренных электронов и импульсного  
электрического поля на биологическую мембрану

Препринт НИИЯФ МГУ-2002-29/713

#### Аннотация

В работе представлены результаты экспериментального исследования комбинированного действия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля на биологическую мембрану.

Елена Карловна Козлова  
Александр Петрович Черняев  
Василий Иванович Шведун  
Александр Михайлович Черныш  
Ульяна Александровна Фомина  
Антон Сергеевич Шаракшанэ  
Полина Юрьевна Алексеева  
Петр Владимирович Горбунов  
Андрей Николаевич Ермаков  
© НИИЯФ МГУ, 2002

В данной работе мы приводим результаты экспериментов комбинированного действия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля, а также УФ излучения и импульсного электрического поля на биологическую мембрану. Известно, что суспензия эритроцитов является хорошо воспроизводимой модельной системой для изучения нарушения мембранных процессов. Поэтому воздействие производилось на мембраны эритроцитов, находящихся в физиологическом растворе. А оценивали это воздействие по кинетике гемолиза. Характер кинетических кривых гемолиза эритроцитов зависит как от природы и характеристик физико-химического воздействия, так и от статистической неоднородности параметров эритроцитов в суспензии (возраста, физиологического состояния).

## 1. Облучение суспензии пучком ускоренных электронов

Экспериментально исследовалась кинетика гемолиза эритроцитов, подвергнувшихся воздействию пучка ускоренных электронов. Эксперименты проводились на *Разрезном Микротроне импульсного действия*. В НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына МГУ им. М.В. Ломоносова создан ускоритель – разрезной микротрон импульсного действия с максимальной энергией пучка 70 МэВ.

Основные параметры ускорителя представлены в таблице 1 [1].

Таблица 1. Параметры разрезного микротрона 70 МэВ

Энергия инъекции	50 кэВ
Прирост энергии / оборот	5,26 МэВ
Число оборотов	14
Энергия на выходе	70 МэВ
Увеличение длины орбиты / оборот	1 л
Рабочая частота	2856 МГц
Ток пучка при 70 МэВ	45 мА
Индукция магнитного поля	0,9 Т
Размеры ускорителя	2 x 0,6 x 0,6 куб. м.

Как можно видеть из таблицы, энергию пучка на выходе можно варьировать. Мы проводили наши эксперименты при энергии 40 МэВ. На расстоянии 30 см от выхода ускорителя по направлению пучка ставилась колба с суспензией эритроцитов. На расстоянии 3 см от выхода ускорителя на пути пучка помещалась титановая фольга 100 мкм, рассеивающая пучок электронов. Это позволяло создать условия равномерного облучения кюветы с суспензией.

*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  $\tau=4-5$  мкс, частота следования импульсов  $f=10$  Гц.

Схема эксперимента показана на рис.1а.

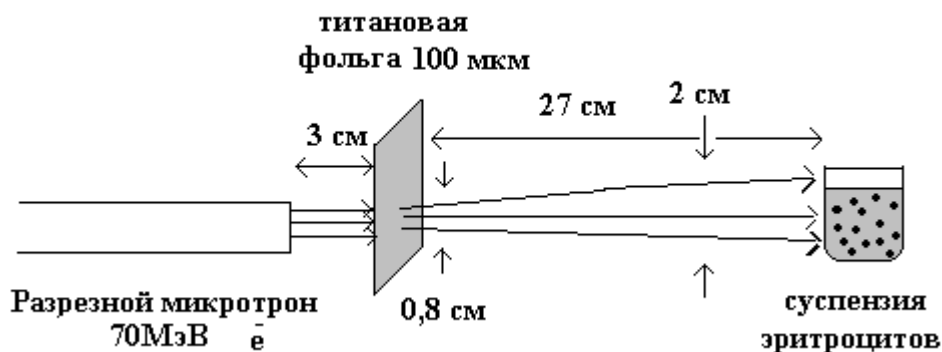


Рис.1а Схема облучения суспензии эритроцитов пучком ускоренных электронов.

Измеряя оптическую плотность раствора с помощью фотоколориметра, можно получить информацию о количестве эритроцитов, имеющихся в данный момент времени в суспензии. Тем самым можно экспериментально построить кинетические кривые гемолиза эритроцитов в данных условиях. В 1 мл исходной суспензии примерно 230 млн. эритроцитов, оптическая плотность слоя 5 мм равнялась 1.

Характерный вид кинетических кривых при воздействии пучка ускоренных электронов в зависимости от тока пучка представлен на рис.1б, от дозы (времени облучения) представлен в работах [2,3], а также на рис.1б,6-8. Кинетической кривой в данном случае является зависимость оптической плотности от времени  $D(t)$ , поскольку оптическая плотность суспензии при гемолизе прямо пропорциональна количеству эритроцитов, находящихся в суспензии в данный момент времени.

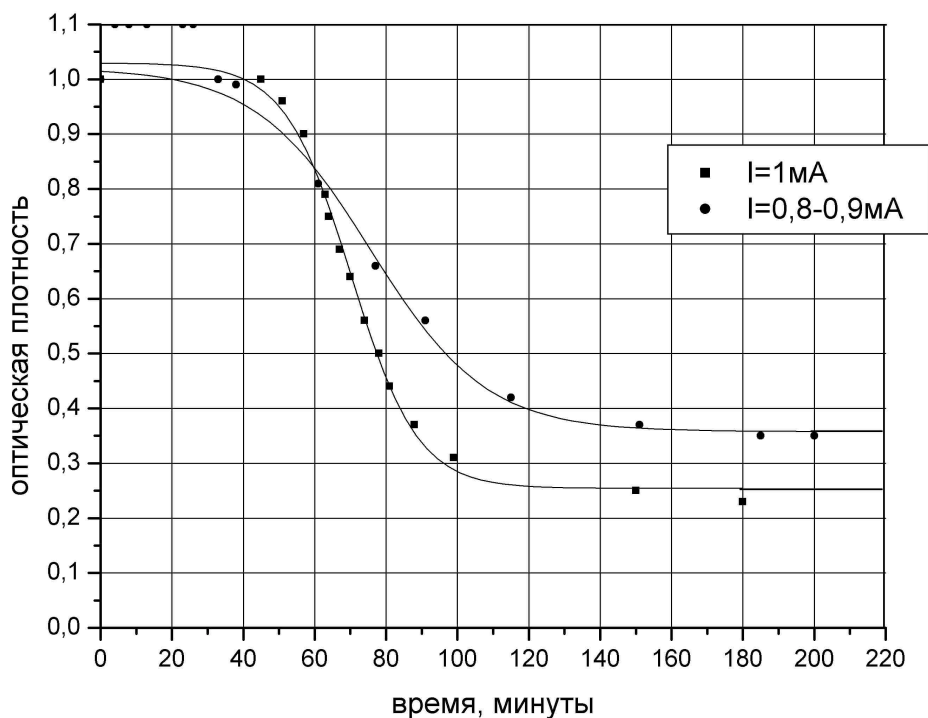
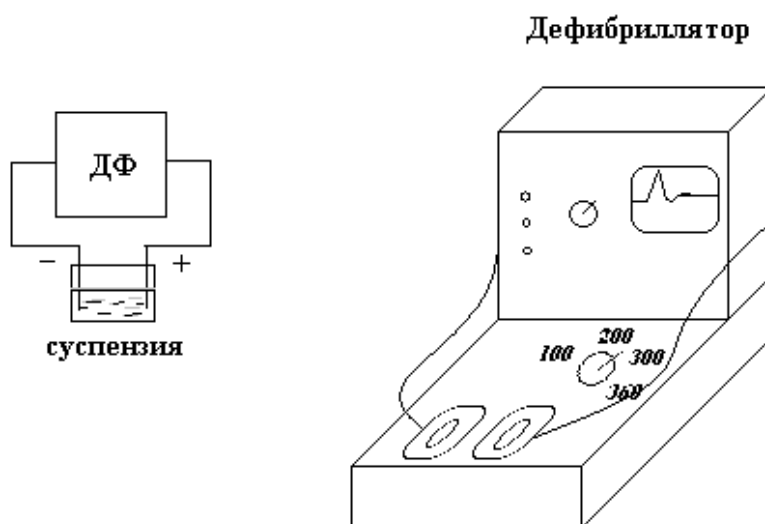


рис.1б Кинетические кривые в результате воздействия пучка ускоренных электронов для разных значений токов пучка ( $I=1mA$ ,  $I=0,8-0,9mA$ )

## 2. Электропорация эритроцитов при воздействии импульсного электрического поля

Гемолиз эритроцитов значительно активизируется при электропорации. В качестве электропоратора использовался дефибриллятор, широко применяющийся в клинике. Электрический импульс подводился к специальным электродам, сделанным из титана, которые опускались в кварцевую кювету (рис.2). В нее же наливалась суспензия эритроцитов в физиологическом растворе (0,05 мл крови в 1 мл 0.9% физиологического раствора).



*Рис.2. Схема электропорации эритроцитов в суспензии с помощью дефибриллятора*

В кювету наливалось 3 мл суспензии. Расстояние между электродами составляло 1,7 см, ширина кюветы 3 см, высота суспензии 0,4 см. Сопротивление суспензии при этом составило 100 Ом.

С помощью дефибриллятора в растворе можно создавать импульсное электрическое поле. Данный дефибриллятор позволяет изменять энергию электрического импульса. Электрическое напряжение в суспензии определяется энергией импульса и сопротивлением раствора. В таблице 2 приведены соответствующие напряжения электрического поля для разных энергий импульса дефибриллятора при сопротивлении раствора 100 Ом.

*Таблица 2. Величина напряжения электрического поля в суспензии для различных энергий электрического импульса*

$E$ , Дж	50	100	200	300	360
$U$ , В	1380	1960	2760	3360	3720

Длительность электрического импульса дефибриллятора 10 мс.

Гемолиз суспензии эритроцитов, подвергнувшихся электропорации импульсным электрическим полем, значительно ускоряется по сравнению с гемолизом контрольной суспензии. На рис.3а и 3б представлены кинетические кривые гемолиза в течение первого часа и в течение нескольких дней после электропорации при различных энергиях электрического импульса. Для сравнения приведена кривая для контрольной суспензии, не подвергнувшейся электропорации. Видно, что величина энергии импульса в значительной степени влияет на

параметры кинетических кривых. При энергиях импульса до 100 Дж ход кинетических кривых практически не изменяется по сравнению с контрольной. Незначительные отличия от контрольных кинетических кривых наблюдались при 130 Дж. Существенные отличия проявлялись при  $E > 200$  Дж. Сглаживание экспериментальных данных осуществлялось сигмоидальными функциями (в программе "Origin"). Для длительных времен сглаживание одной только функцией было невозможно, поэтому точки соединены линиями в режиме интерполяции.

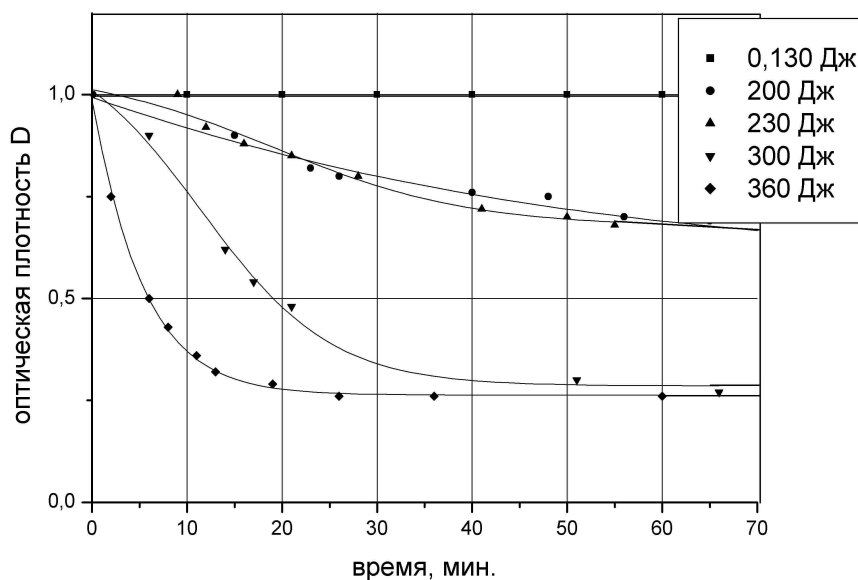


рис.3а Кинетические кривые в результате воздействия импульсного электрического поля (энергия импульса  $E=0, 130, 200, 230, 300, 360$  Дж) в первые 70 минут

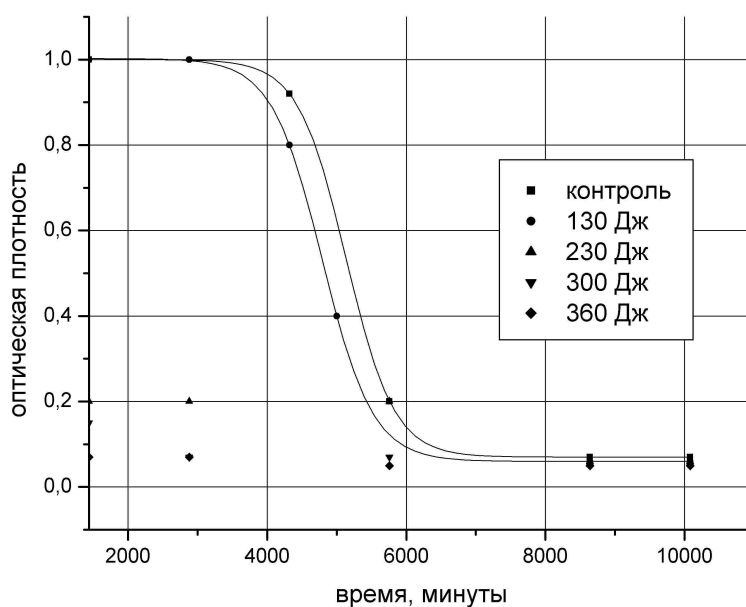
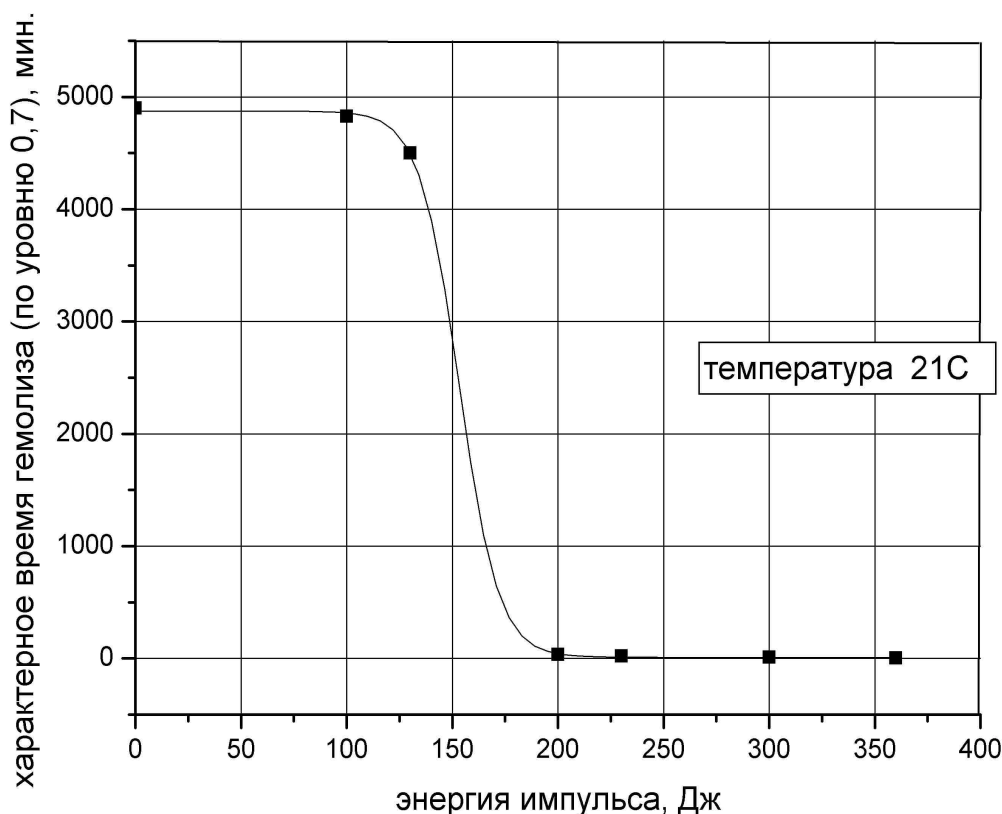


рис.3б Кинетические кривые в результате воздействия импульсного электрического поля (энергия импульса  $E=0, 130, 200, 230, 300, 360$  Дж) в течение промежутка времени от 1440 до 10000 минут

На рис. 4а представлен график зависимости времени уменьшения количества эритроцитов до уровня 0,7 от начального ( $T_{0,7}$ ) от энергии электрического импульса. За время ( $T_{0,7}$ ) гемолизируется 30% эритроцитов, величина  $0,3/T_{0,7}$  наиболее адекватно описывает скорость процесса “быстрой” стадии гемолиза (резкое уменьшение количества эритроцитов в первые 10-60 минут после воздействия), так как в этой стадии повреждается только 60% клеток. Таким образом  $T_{0,7}$  – время, за которое гемолизирует половина эритроцитов, участвующих в “быстром” гемолизе. С увеличением энергии импульса время  $T_{0,7}$  уменьшается (рис.4а,б). Видно, что пробой наступает при энергиях около 130 Дж. Этим энергиям импульса дефибриллятора соответствует электрическое напряжение в суспензии  $U \approx 2200$  В. Таким образом, пороговое напряжение для электропорации мембраны эритроцитов в суспензии в данных условиях составило  $U_{пор.} \approx 2200$  В. При напряжениях, больших этого значения, интенсивно развивался гемолиз.



*Рис.4а Зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,7) от энергии электрического импульса (100, 130, 200, 230, 300, 360 Дж) при комнатной температуре 21С.*

Существенными факторами, влияющими на характерные времена гемолиза ( $T_{0,7}$  и  $T_{0,5}$ ) являются температура суспензии и время нахождения эритроцитов в физиологическом растворе.

На рис.5а показана зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,5) от времени нахождения эритроцитов в физиологическом растворе к моменту воздействия электрическим импульсом с энергиями 230 Дж и 300 Дж при 16°C. Как

видно из рисунка, в первые 100 минут результаты пробы могут существенно различаться друг от друга.

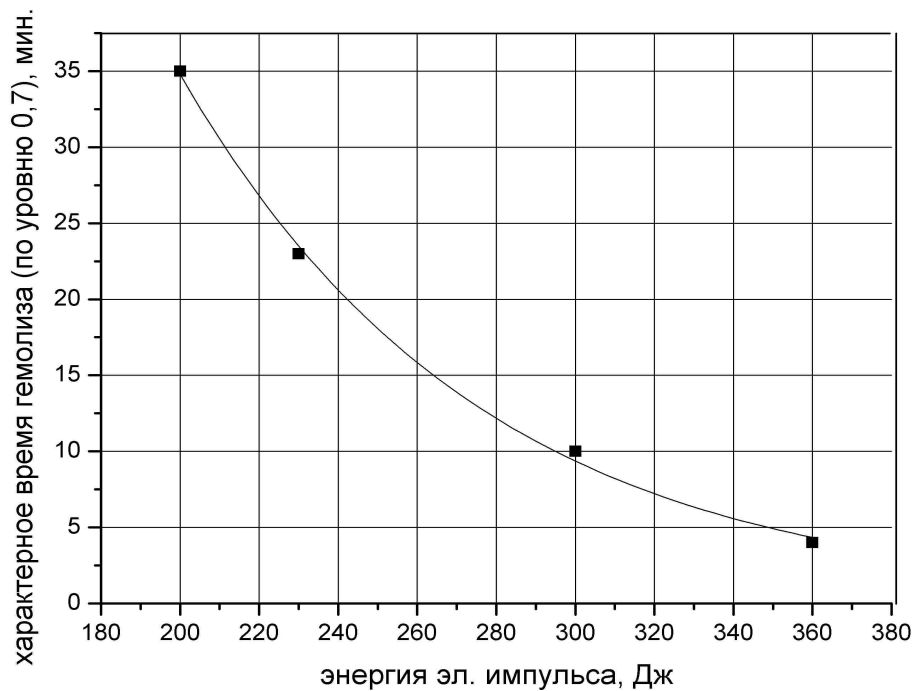


Рис.4б Зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,7) от энергии электрического импульса (200,230,300,360 Дж).

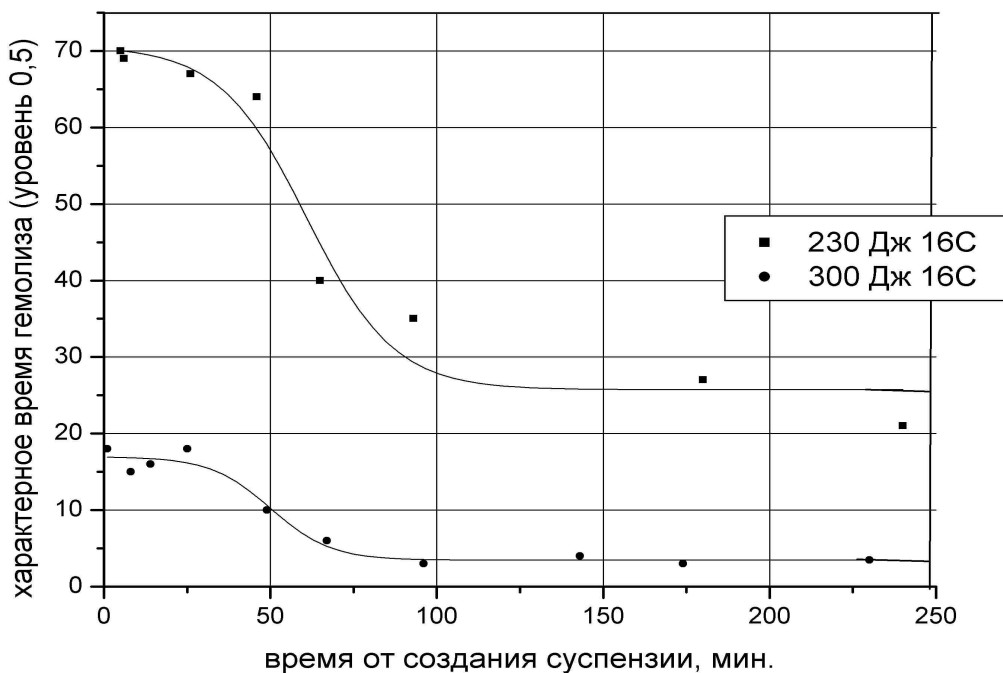
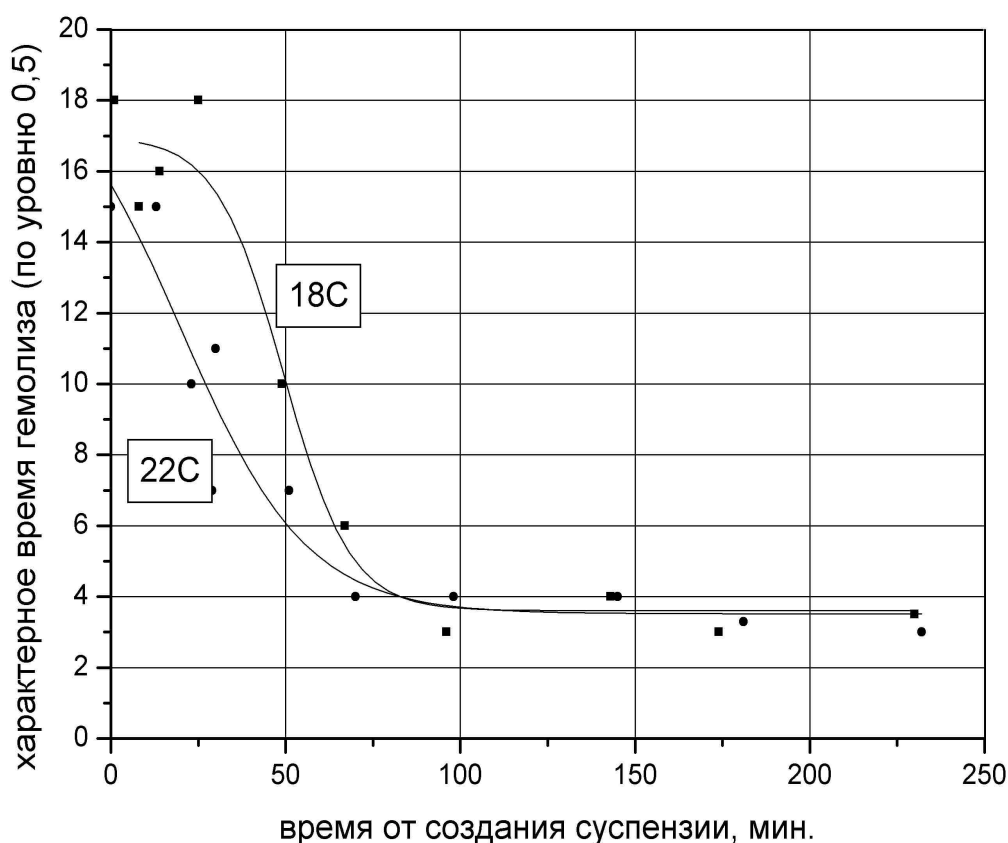


Рис.5а Зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,5) от времени нахождения эритроцитов в физиологическом растворе к моменту воздействия электрическим импульсом (230,300Дж) при комнатной температуре 16С.



Данная зависимость связана с переходными процессами, развивающимися в суспензии эритроцитов после того, как они «попали» из кровеносной системы в физиологический раствор. Действительно, на рис.5б показано влияние температуры суспензии на характерное время гемолиза  $T_{0,5}$  при электропорации с энергией электрического импульса 300Дж. Как можно заметить, при  $t=22^{\circ}\text{C}$  в первые 15 минут суспензию нельзя уже рассматривать, как квазистационарную, в отличие от  $t=16^{\circ}\text{C}$ . Поэтому, если в это время провести электропорацию, то на результаты исследования окажет влияние не только конкретное внешнее физическое воздействие, но и существенно повлияет момент времени электропорации, что крайне нежелательно.



*Рис.5б Зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,5) от времени нахождения эритроцитов в физиологическом растворе к моменту воздействия электрическим импульсом (300Дж) при различной комнатной температуре (18,22C).*

Приблизительно через 100 минут состояние эритроцитов выходит на квазистационарный уровень. Таким образом, именно через это время после создания суспензии и следует проводить экспериментальные исследования воздействия на эритроциты различных физических факторов.

### 3. Комбинированное действие на суспензию эритроцитов пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля

Представляется интересным экспериментальное исследование комбинированного воздействия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля на систему эритроцитов. Сначала суспензию облучали пучком ускоренных электронов, а затем ее сразу подвергали воздействию электрического импульса дефибриллятора.

Облучение суспензии проводилось пучком электронов с энергией 40 МэВ, ток в импульсе  $I=1\text{мА}$ . Электропорация проводилась электрическим импульсом 230 Дж.

На рис. 6 приведены соответствующие кинетические кривые. Видно, что скорость изменения численности эритроцитов после комбинированного воздействия ( $Ve+E$ ) в первые 40 минут больше, чем сумма скоростей изменения по отдельности за счет электропорации в результате воздействия импульсного электрического поля ( $VE$ ) и скорости гемолиза в результате воздействия электронов ( $Ve$ ). Возможно, это связано с изменением состояния эритроцитов под действием ускоренных электронов, в частности состояния мембраны, что может снижать порог электропорации и ускорять гемолиз в целом.

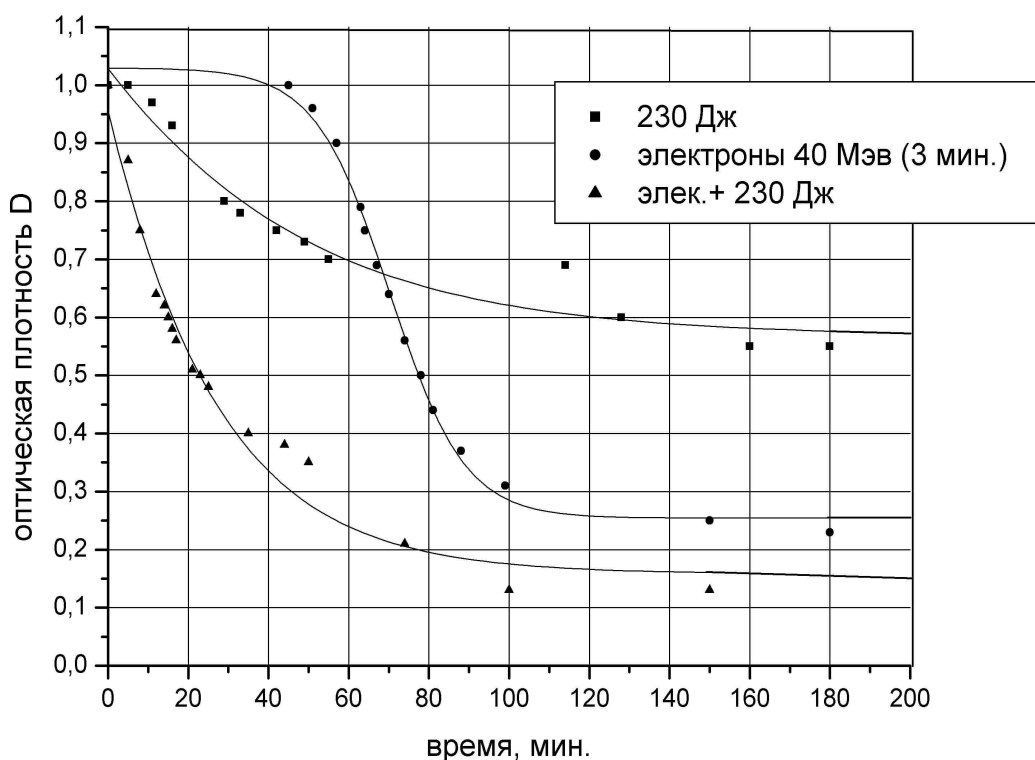


Рис.6 Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=1\text{мА}$ ) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ).

На рис.7-ой серии представлены кинетические кривые гемолиза суспензии эритроцитов, происходящего в аналогичных условиях воздействия на систему, но ток в импульсе составлял  $I=0,7\text{мА}$ ,  $I_{\text{ср}}=0,035\text{мкА}$ , энергия электронов 40 МэВ.

Время облучения 1,5, 4 и 7 мин.. На рис.7б,г,е одновременно представлены кривые гемолиза в течение 1-10 дней для следующих суспензий:

- контрольная,
- после облучения электронами,
- после воздействия импульсным электрическим полем,
- комбинация действия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля.

В то время, как оптическая плотность контрольной суспензии практически не менялась, кинетические кривые гемолиза суспензии, облученной электронами, суспензии, подвергнутой воздействию импульсным электрическим полем, а также суспензии, «перенесшей» оба воздействия резко упала в первые 3 часа после воздействий. На рис.7а,в,д приведены данные для первых 200 минут, соответствующие рис. 7б,г,е. При этом скорость гемолиза в первые 20-40 минут после комбинированного воздействия  $V_{e+E}$  больше, чем сумма скоростей гемолиза после каждого воздействия по отдельности

$$V_{e+E} > V_e + V_E. (1)$$

Например, из рис. 6 легко вычислить эти скорости по формуле:

$$V=1/T_{0,7} (2)$$

$$\begin{aligned} V_e &= 0,014 \text{ (1/мин.)}, \\ V_E &= 0,016 \text{ (1/мин.)}, \\ V_{e+E} &= 0,083 \text{ (1/мин.)}. \end{aligned}$$

Очевидно, что при подстановке этих цифр в формулу (1) неравенство окажется верным.

На рис. 8а представлены одновременно кинетические кривые гемолиза после комбинированного воздействия для разных времен облучения. Зависимость  $T_{0,7}$  от времени облучения (дозы) носит нелинейный характер (рис.8б).

Следует отметить, что уменьшение тока электронов на 20-30% несколько изменило характер кинетических кривых. Для сравнения представлены соответствующие кривые на рис.9а,б.

При этом энергия электронов не менялась, а токи в импульсе составляли 1 мА и 0,7 мА. Видно, что «быстрая» составляющая гемолиза (в течение первых 20-40 минут) практически не изменяется. Однако уровень «медленной» составляющей при токе в импульсе 0,7мА (средний ток 0,035мкА) составил примерно 0,2 и поддерживался таким образом в течение нескольких дней (рис.7а,в,д).

На рис. 9в приведены скорости гемолиза эритроцитов в суспензии облученной электронами и в суспензии, подверженной комбинированному действию (для первых 40 мин) в зависимости от энергии электрического импульса. Скорость оценивалась по формуле

$$V=\Delta D /60 \text{ (1/мин.)}.$$

Здесь наблюдается смещение «порога» энергии электрического импульса, необходимой для активного развития гемолиза.

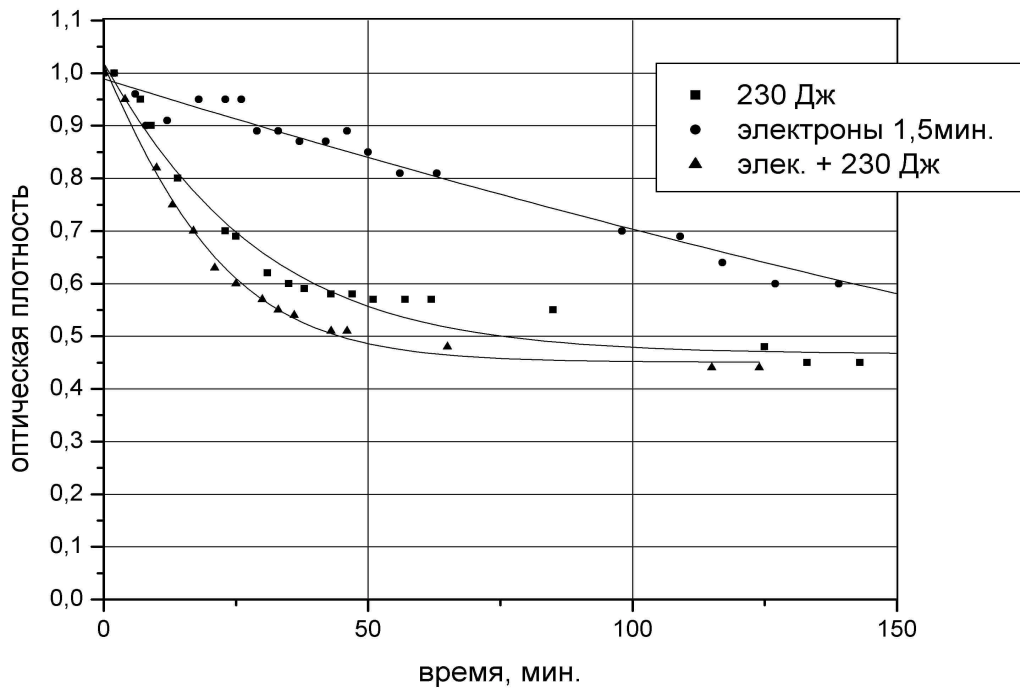


Рис.7а Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=0.7\text{мА}$ , время облучения 1,5 мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) в течение первых 150 мин.

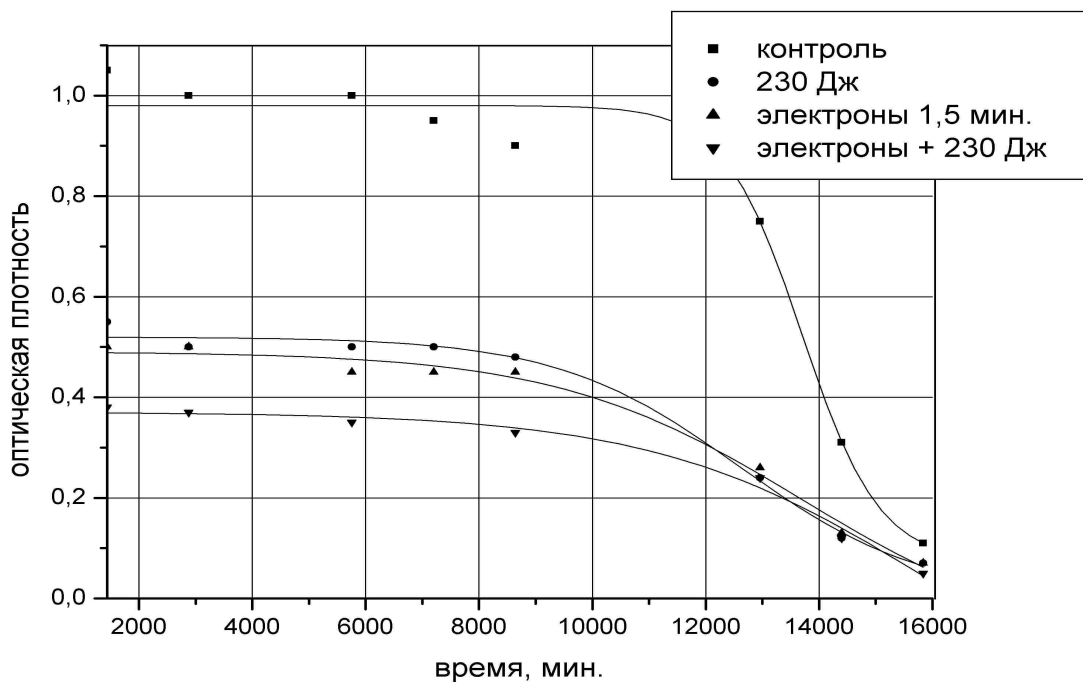


Рис.7б Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=0.7\text{мА}$ , время облучения 1,5 мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) в промежутке времени от 2000 до 16000 мин.

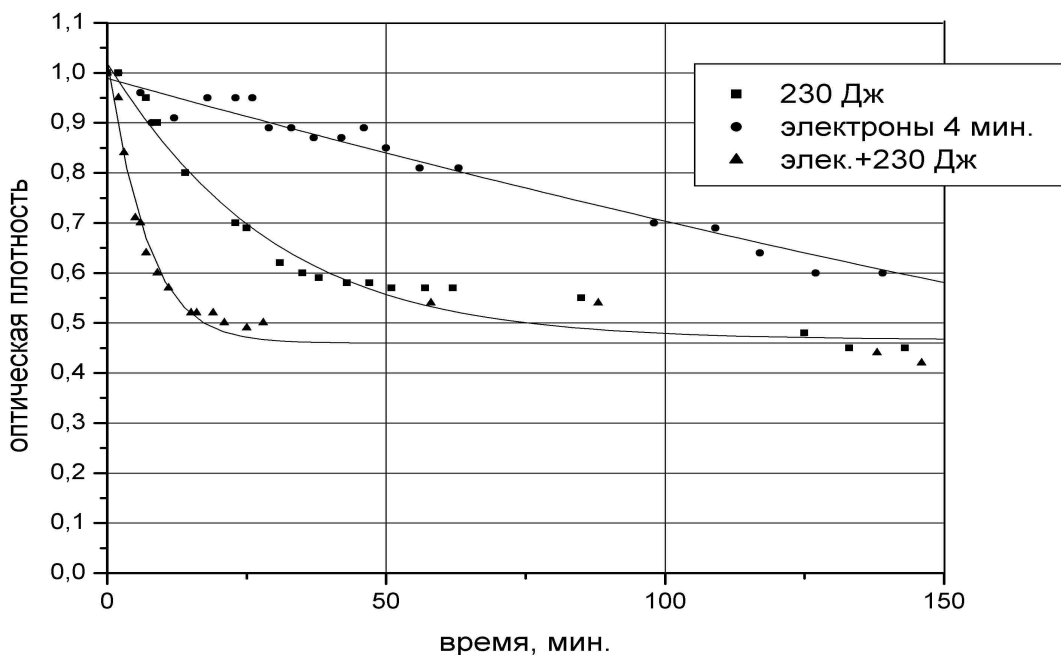


Рис.7в Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=0.7\text{мА}$ , время облучения 4мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) в течение первых 150 мин.

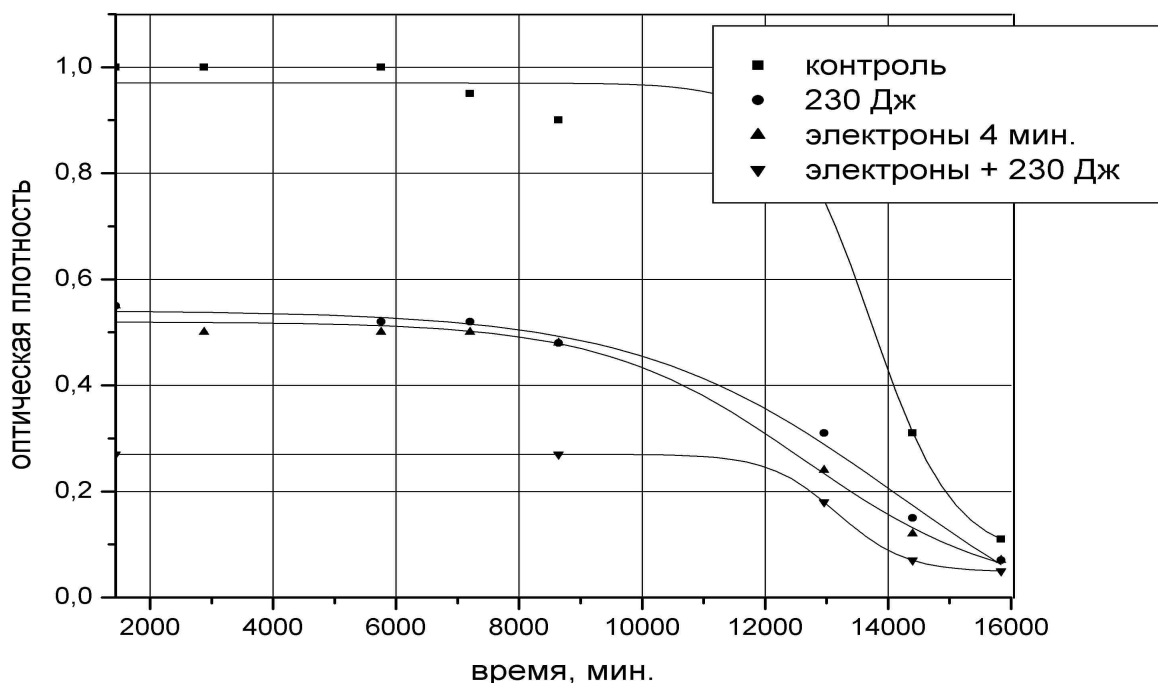


Рис.7г Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=0.7\text{мА}$ , время облучения 4мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) в промежутке времени от 2000 до 16000 мин.

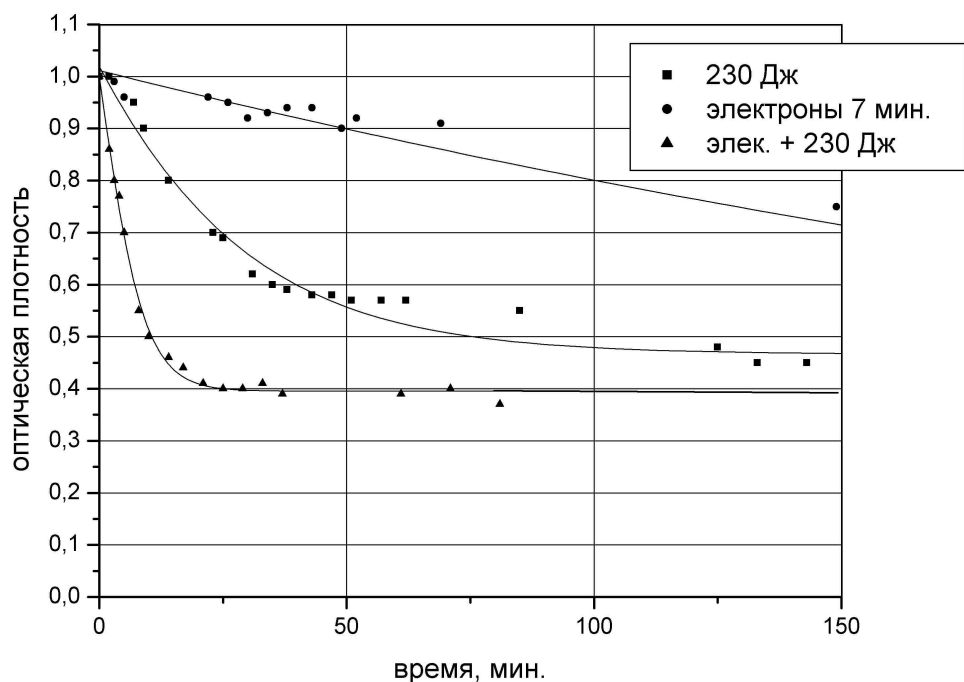


Рис.7д Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=0.7\text{мА}$ , время облучения 7мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) в течение первых 150 мин.

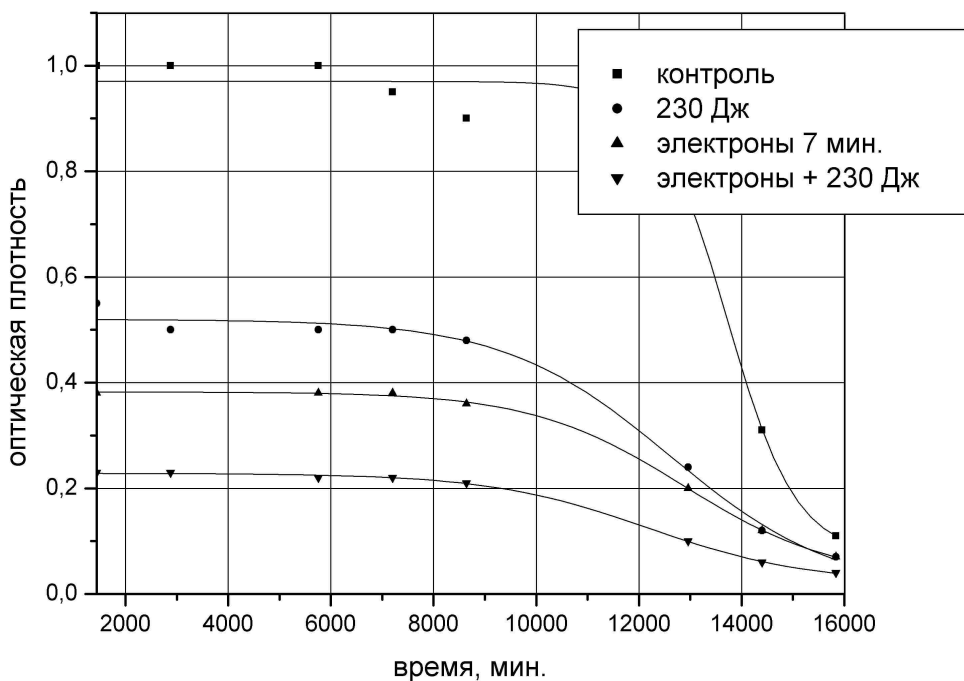


Рис.7е Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=0.7\text{мА}$ , время облучения 7мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) в промежутке времени от 2000 до 16000 мин.

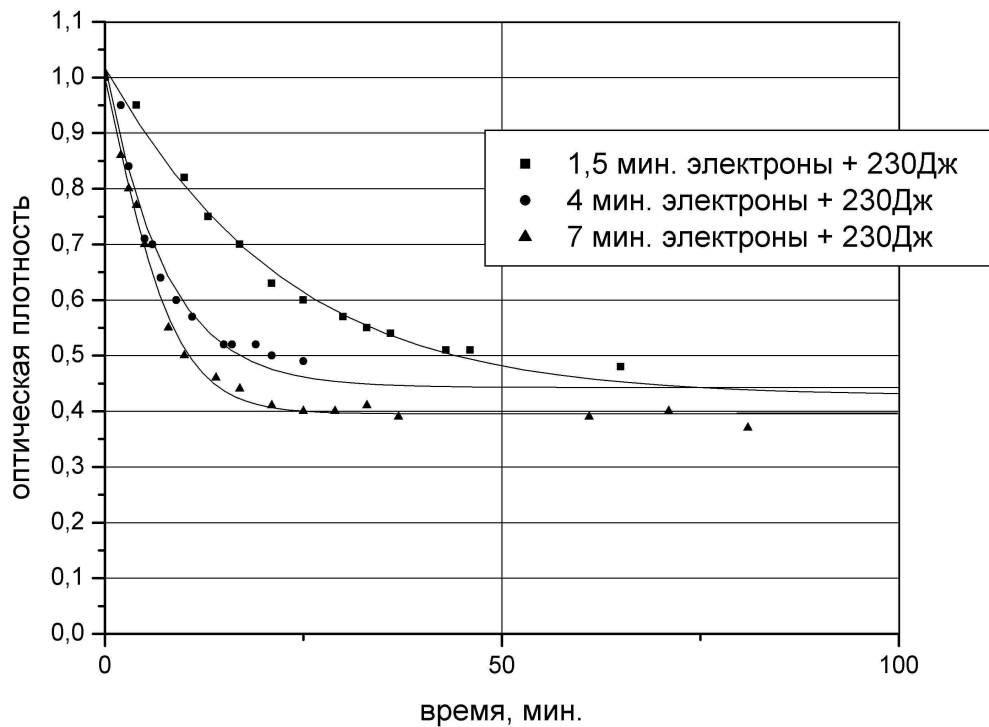


Рис.8а Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=0.7\text{мА}$ ) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) для разных времен облучения (1.5,4,7мин).

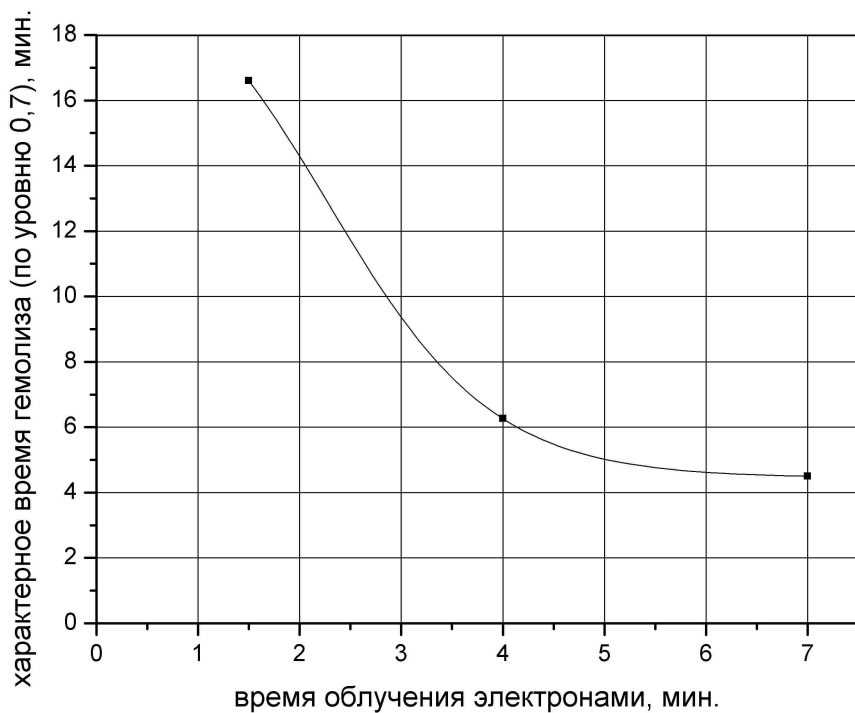


Рис.8б Зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,7) от времени воздействия пучком ускоренных электронов (1.5,4,7мин)

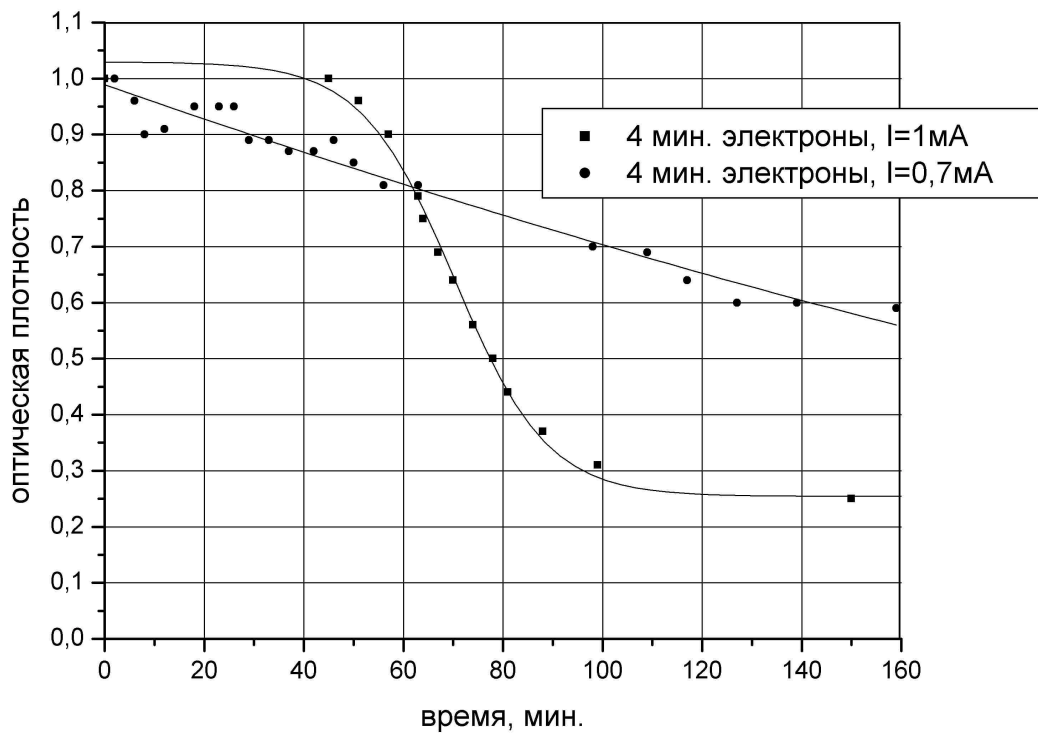


Рис.9а Кинетические кривые в результате воздействия пучком ускоренных электронов (время облучения 4мин) для разных значений тока пучка  $I=0.7, 1\text{mA}$ .

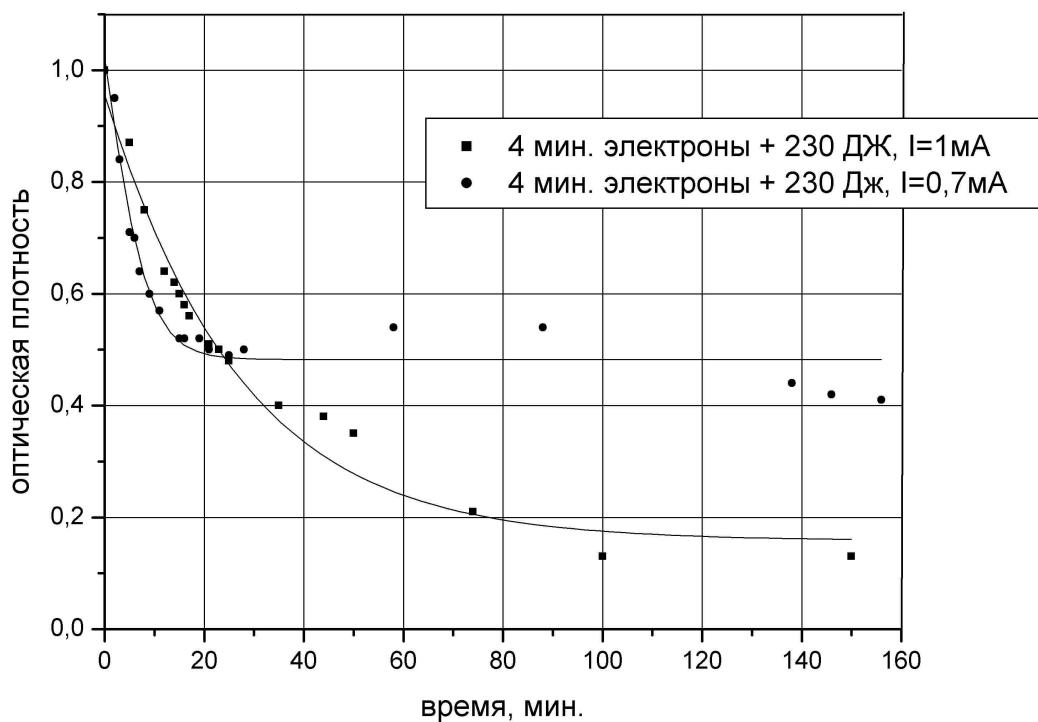
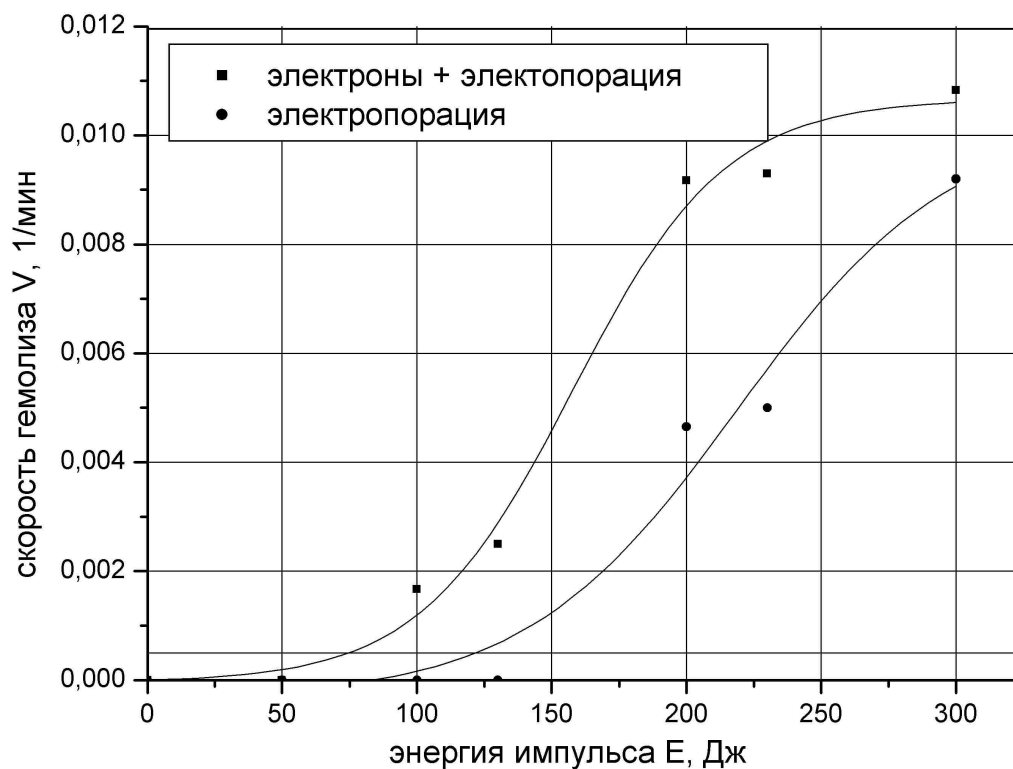


Рис.9б Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (время облучения 4мин) и импульсным электрическим полем ( $E=230\text{Дж}$ ) для разных значений тока пучка  $I=0.7, 1\text{mA}$





*Рис.9в Зависимость скорости гемолиза от энергии электрического импульса (0-360Дж) в результате воздействия импульсным электрическим полем и комбинированного воздействия пучком ускоренных электронов (ток пучка  $I=1\text{мА}$ , время облучения 4мин) и импульсным электрическим полем.*

#### 4. Облучение суспензии эритроцитов ультрафиолетовым излучением

Суспензия начальной концентрации облучалась с помощью ультрафиолетовой лампы УФС-254. На рис.10 показана схема облучения.

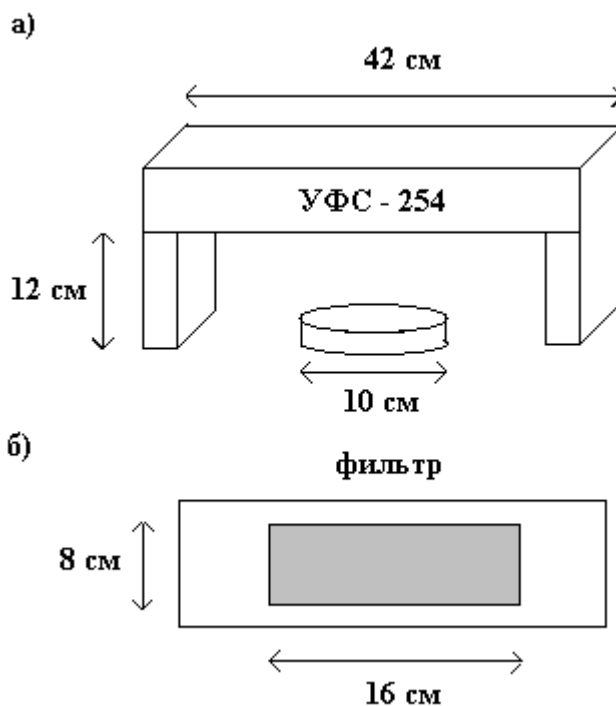


рис.10 а) схема облучения ультрафиолетом суспензии эритроцитов;  
б) размеры и форма фильтра, вырезающего длину волны  $\lambda=254$  нм.

Время облучения, а соответственно и доза варьировались. Геометрия лампы и фильтра позволила равномерно облучать весь раствор в чашке Петри.

На рис. 11а,б представлены кинетические кривые гемолиза при действии на суспензию эритроцитов УФ излучения для разных времен облучения.

В свою очередь на рис.11б показаны кинетические кривые гемолиза при 18°C, характерное время гемолиза контрольной суспензии составляло около 3,5 дней. Кинетические кривые на рис.11а и 11б согласуются между собой, а также с общеизвестным фактом нелинейной зависимости скорости гемолиза от дозы облучения.

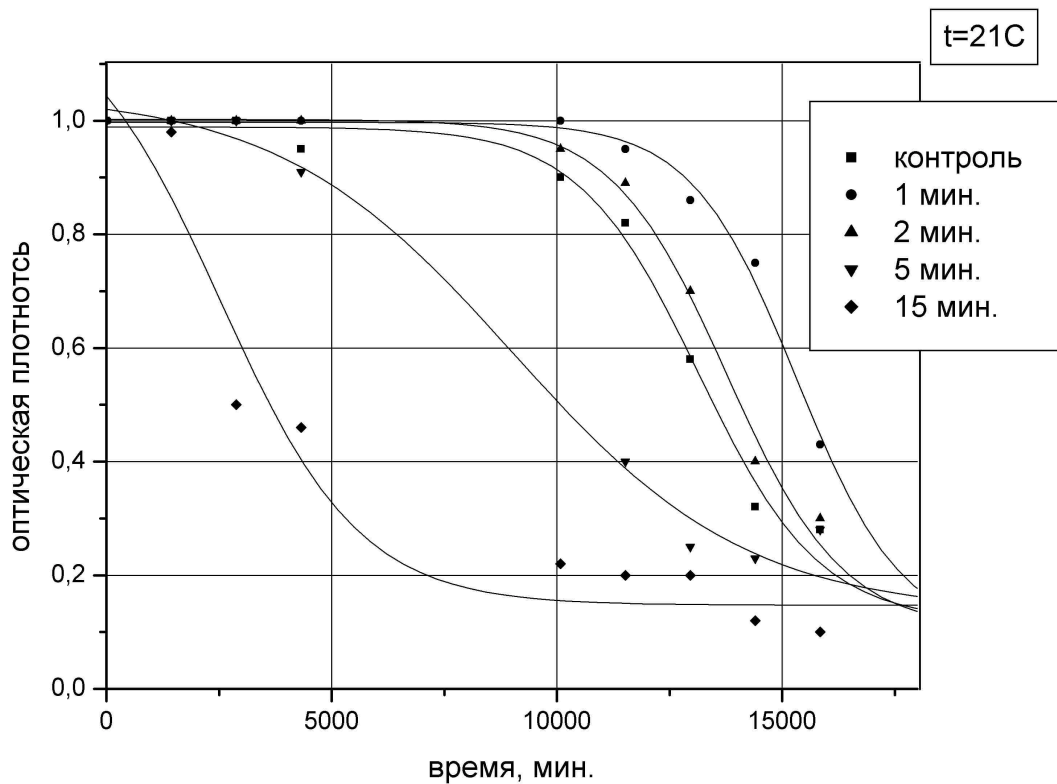


Рис.11а Кинетические кривые в результате воздействия УФ излучением для разных времен воздействия (0,1,2,5,15мин) при комнатной температуре 21С.

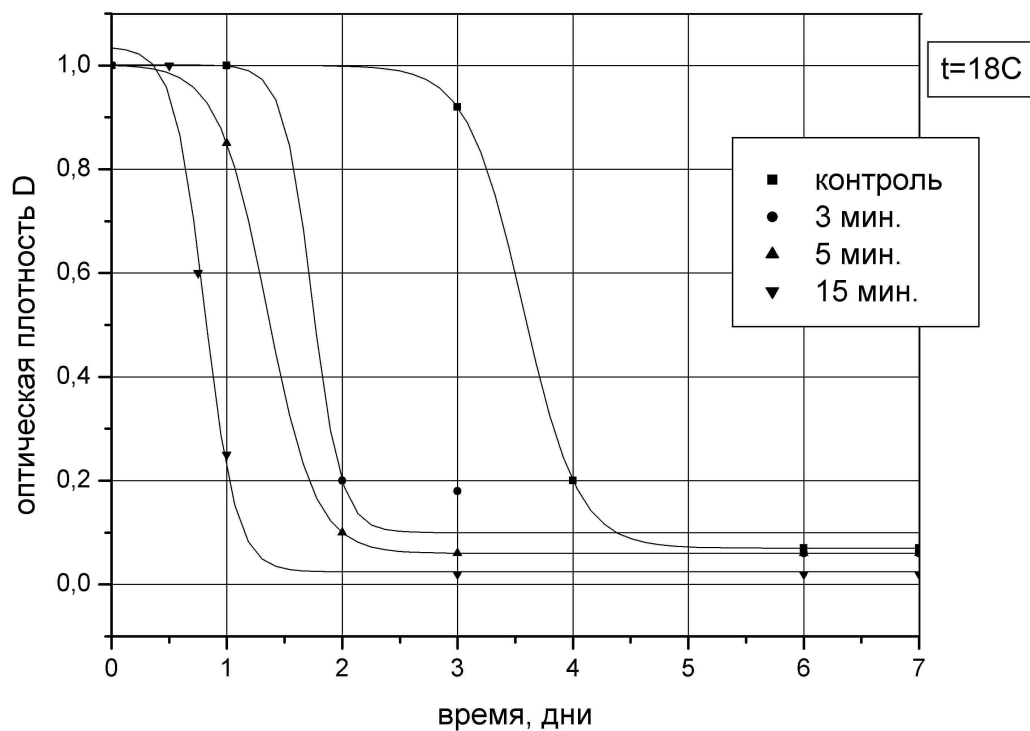


Рис.11б Кинетические кривые в результате воздействия УФ излучением для разных времен воздействия (0,3,5,15мин) при комнатной температуре 18С.

В свою очередь на рис.11б показаны кинетические кривые гемолиза при 18°C, характерное время гемолиза контрольной суспензии составляло около 3,5 дней. Кинетические кривые на рис.11а и 11б согласуются между собой, а также с общеизвестным фактом нелинейной зависимости скорости гемолиза от дозы облучения.

## 5. Комбинированное действие на суспензию эритроцитов УФ излучения и импульсного электрического поля

На рис.12а,б,в для сравнения представлены кинетические кривые для суспензий, подвергнутых различным воздействиям:

- контрольная,
- после облучения УФ
- после воздействия импульсным электрическим полем
- после облучения УФ и последующего воздействия импульсным электрическим полем.

Время облучения составляло 2 минуты, электропорация проводилась электрическими импульсами различной энергии (230 Дж, 300 Дж, 360 Дж).

Как видно из рисунков 12а,б,в, кинетика контрольной суспензии практически такая же, как и у облученной УФ, но все-таки эритроциты под действием УФ гемолизируются быстрее. Особенно это заметно при длительных временах (см. рис.17а,б). При малых же временах кривые (контроль и УФ) ведут себя одинаково. Что же касается суспензий, подвергнутых электропорации ИЭП и комбинированному действию, то их скорость гемолиза намного больше, чем после УФ или скорости гемолиза контрольной суспензии. Проанализируем скорости процессов. На рисунках подробно показаны данные для первых 3 часов наблюдения. Оптическая плотность контрольной суспензии и суспензии, облученной УФ в этот период времени равна 1,0. Таким образом, при малых временах наблюдения скорость гемолиза эритроцитов, облученных УФ, примерно равна 0. Соответствующие скорости процессов равны:  $V_E = 0,015$  (1/мин.),  $V_{УФ+E} = 0,027$  (1/мин.) (из рис.12а). Видно, что

$$V_{УФ+E} > V_{УФ} + V_E. \quad (3)$$

Характерное время гемолиза  $T_{0,7}$  при электропорации 230 Дж (рис.12а) составляет примерно 20 минут, а характерное время гемолиза суспензии, подвергшейся комбинации воздействия УФ излучения и дефибриллятора составляет примерно 11 минут. Таким образом, можно утверждать, что скорость гемолиза суспензии после комбинированного воздействия не равна сумме скоростей гемолиза суспензий с разными воздействиями по отдельности (3). Аналогичные результаты с электропорацией 300 и 360 Дж.

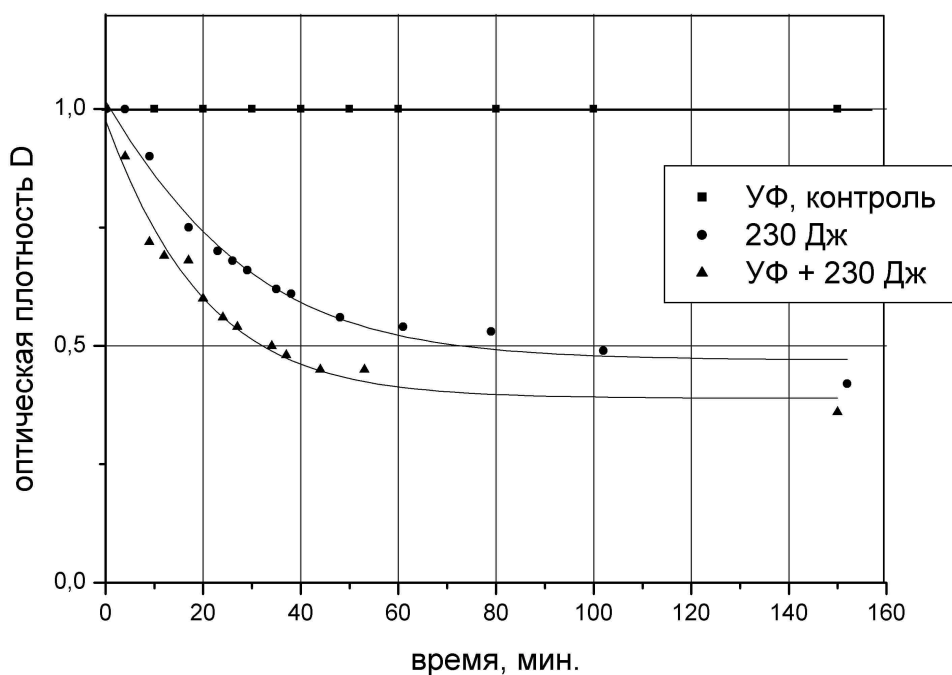


Рис.12а Кинетические кривые в результате воздействия УФ излучением (время облучения 2мин), импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230Дж$ ) и их комбинированном воздействии

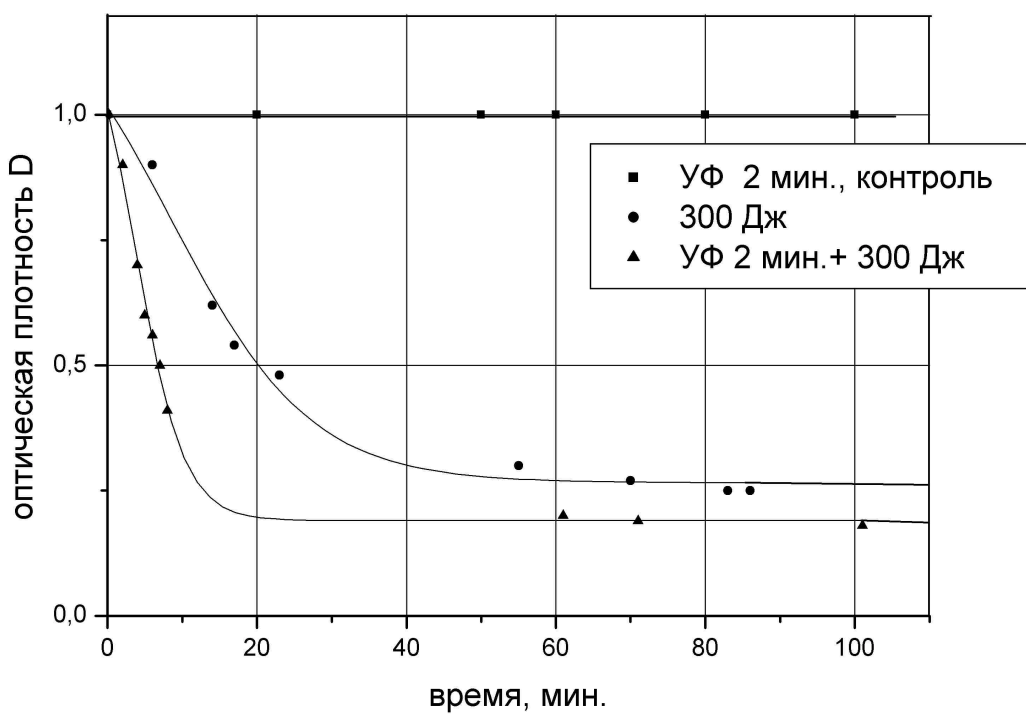


Рис.12б Кинетические кривые в результате воздействия УФ излучением (время облучения 2мин), импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=300Дж$ ) и их комбинированном воздействии

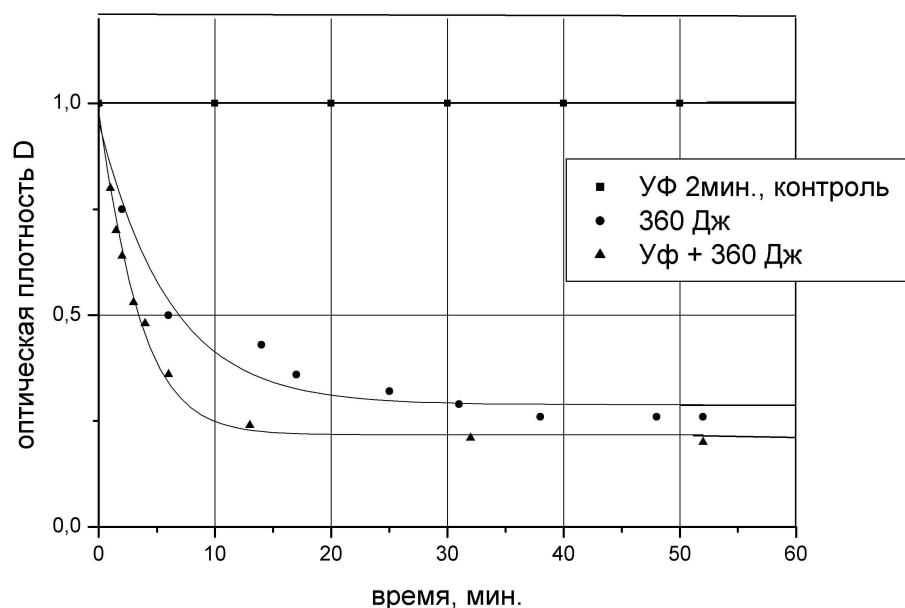


Рис.12в Кинетические кривые в результате воздействия УФ излучением (время облучения 2мин), импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=360\text{Дж}$ ) и их комбинированном воздействии.

На рис.12г представлены результаты комбинированного воздействия для разных энергий электрического импульса дефибриллятора. Как видно из рисунка, с увеличением энергии скорость гемолиза при комбинированном воздействии УФ излучения и импульсного электрического поля возрастает, характерное время гемолиза уменьшается. Это заметно только на малых временах наблюдения, так как после некоторого времени кривые выходят на плато.

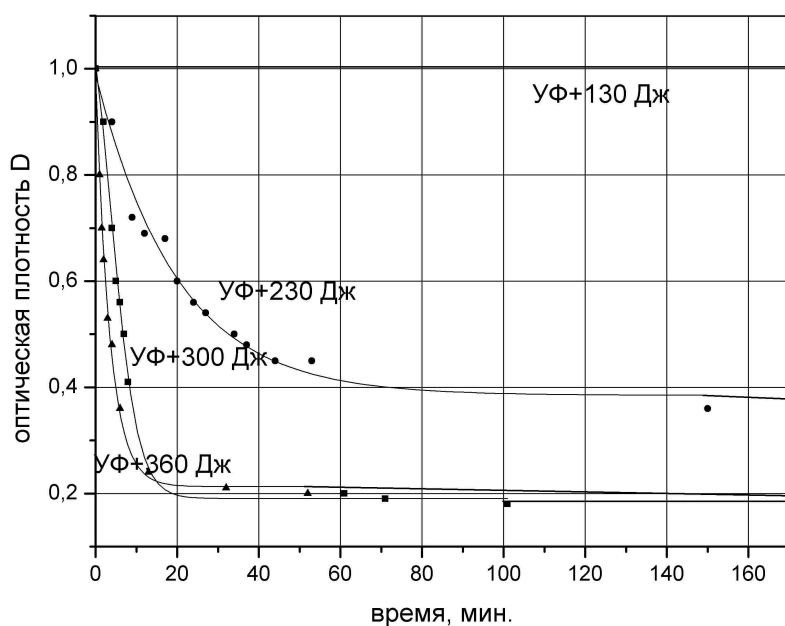


Рис.12г Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия УФ излучением (время облучения 2мин) и импульсным электрическим полем для разной энергии импульса  $E=130, 230, 300, 360\text{Дж}$ .

Существенное изменение происходит при переходе от 130 Дж до 200 Дж. Из рис.13 видно, что параметры кривых гемолиза комбинированного действия для импульсов энергий 230 Дж и 130 Дж существенно отличаются.

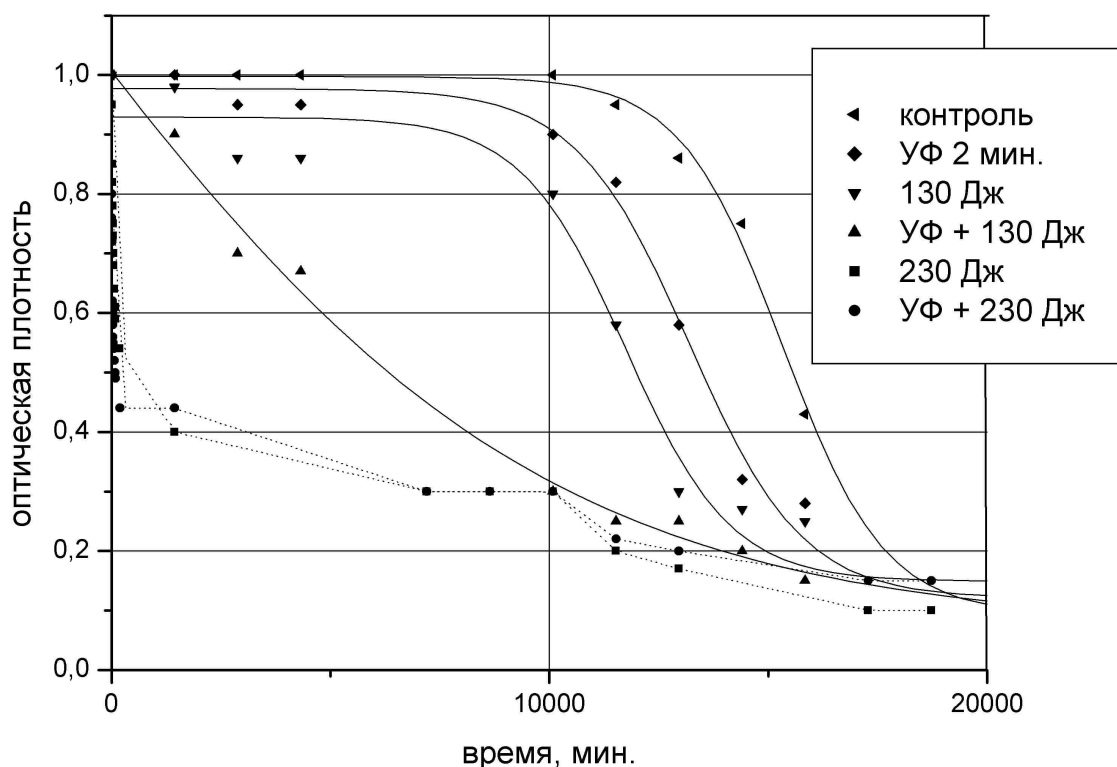


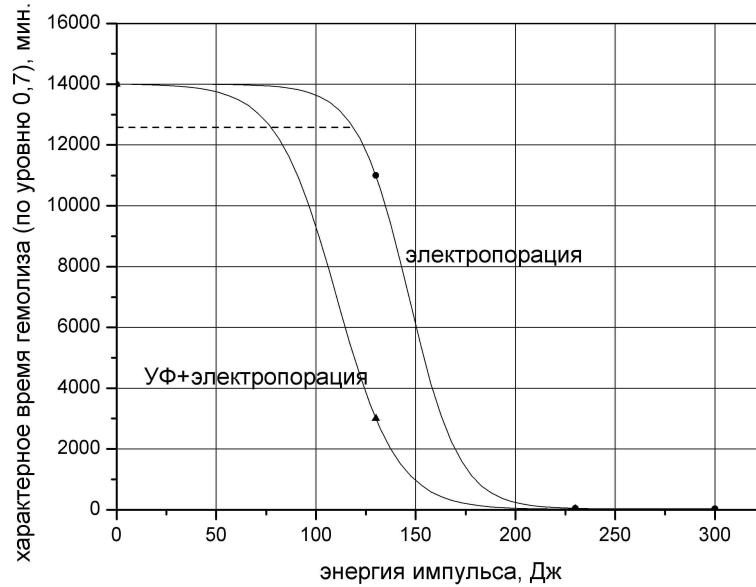
Рис.13 Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия УФ излучением (время облучения 2мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=130$  и  $230$ Дж).

Причем, существенно различаются кривые гемолиза при электропорации 130 Дж и при комбинированном воздействии (2 мин. УФ и 130 Дж). Как было сказано ранее, при воздействии электрическим импульсом 130 Дж кинетика гемолиза мало отличается от кинетики контрольной суспензии (рис.3а,б). Но если суспензию сначала облучить УФ, а затем воздействовать импульсом 130 Дж, то кинетика имеет явно другой характер, нежели на рис.3а,б. Таким образом, можно говорить о нелинейности воздействий.

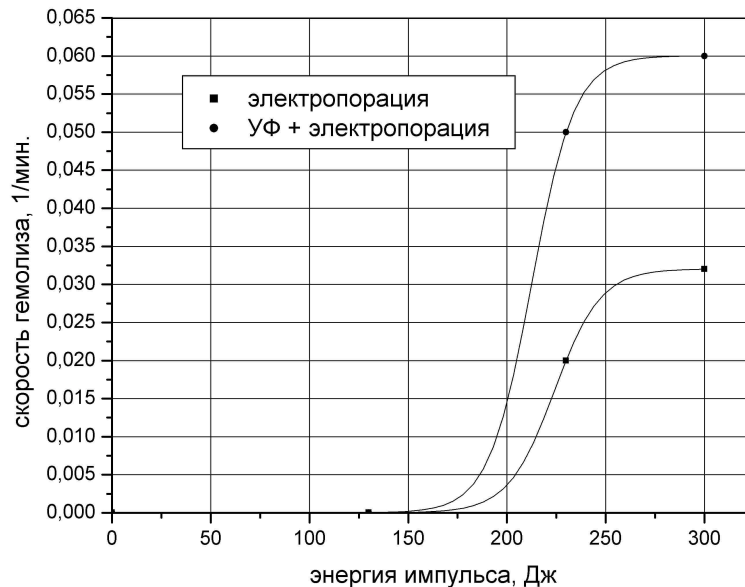
На рис.14а приведена зависимость времени  $T_{0,7}$  от энергии импульса при комбинированном действии УФ излучения и просто при воздействии импульсным электрическим полем.

Для оценки эффекта можно ввести уровень 0,9 от максимального  $T_{0,7}$  (когда  $E=0$ ). В этом случае видно, что порог активного развития гемолиза при данных условиях эксперимента составляет  $E_{пор.}=126$  Дж без предварительного облучения УФ и  $E_{пор.}=77$  Дж при комбинированном воздействии.

Можно привести зависимость скорости гемолиза от энергии электрического импульса при воздействии импульсным электрическим полем отдельно и при комбинированном действии УФ излучения и импульсного электрического поля (рис.14б).



*Рис.14а Зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,7) от энергии электрического импульса (0-300Дж) в результате воздействия импульсным электрическим полем и комбинированного воздействия УФ излучения (время облучения 2мин) и импульсным электрическим полем.*



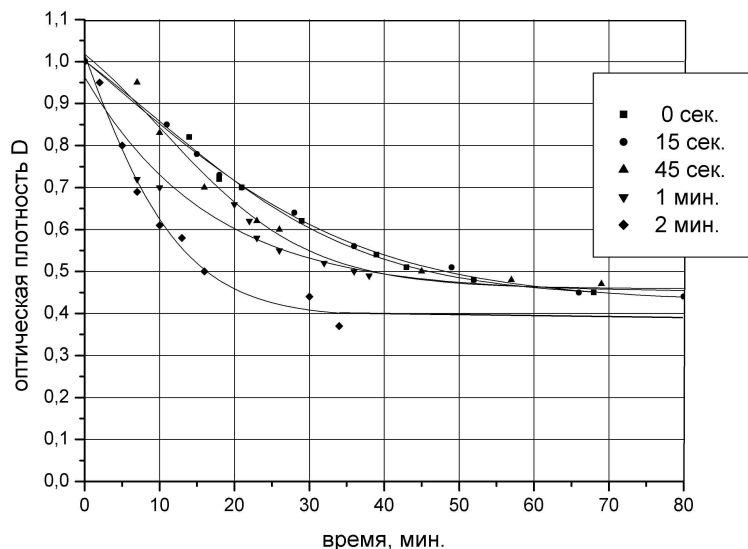
*Рис.14б Зависимость скорости гемолиза от энергии электрического импульса (0-300Дж) в результате воздействия импульсным электрическим полем и комбинированного воздействия УФ излучения (время облучения 2мин) и импульсным электрическим полем.*

На эффект комбинированного воздействия влияет доза, которая в данных экспериментах варьировалась за счет времени облучения.

На рис.15 показаны кинетические кривые гемолиза при комбинации УФ излучения и импульсного электрического поля для различных доз УФ излучения (время облучения варьировалось от 15 с до 2 мин). Как видно из рисунка с



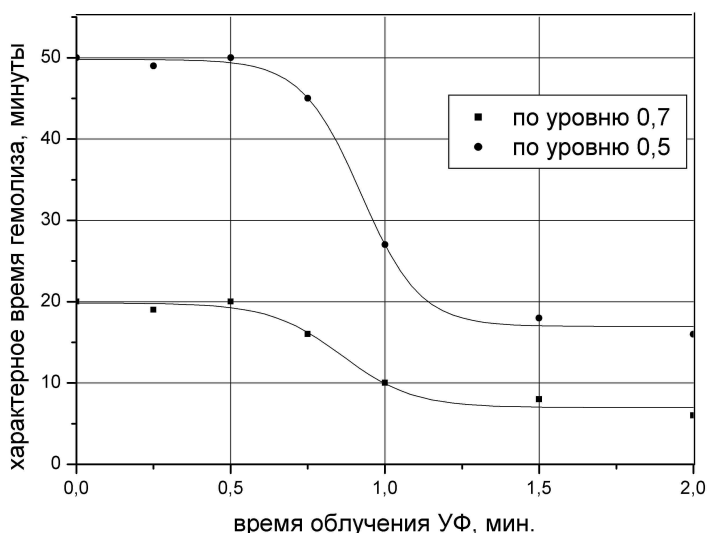
увеличением дозы облучения скорость гемолиза увеличивается (по наклону кривых в точке  $T_{0,7}$ ).



*Рис. 15 Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия УФ излучением и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230Дж$ ) для разных времен облучения (0,15,45,60,120сек).*

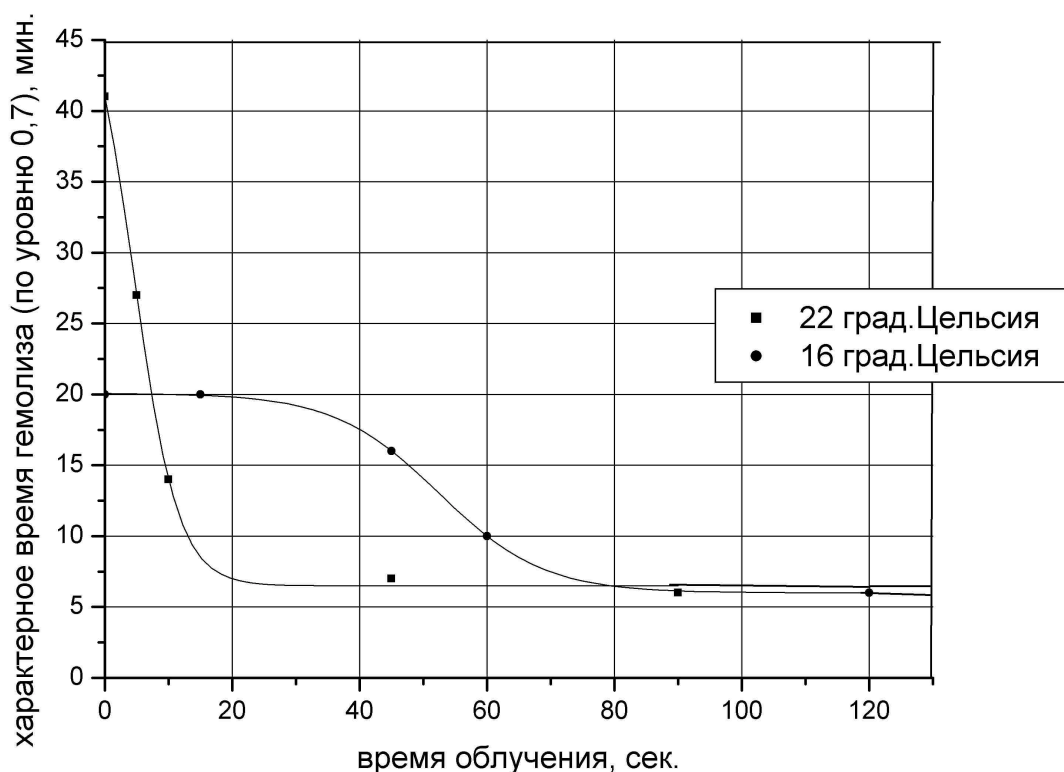
С увеличением дозы несколько уменьшается остаточный уровень процесса. Это согласуется с общепризнанными представлениями кривых «доза-эффект» [4,5,6].

На рис.16а приведены зависимости  $T_{0,7}$  и  $T_{0,5}$  от дозы УФ излучения (времени облучения) при комбинированном воздействии для электрического импульса с энергией электрического импульса 230 Дж, температура суспензии  $16^{\circ}C$ . С увеличением времени УФ воздействия на систему характерное время гемолиза уменьшается.



*Рис. 16а Зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,5 и 0,7) от времени воздействия УФ излучением (0-2мин) в результате комбинированного воздействия УФ излучением и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230Дж$ ).*

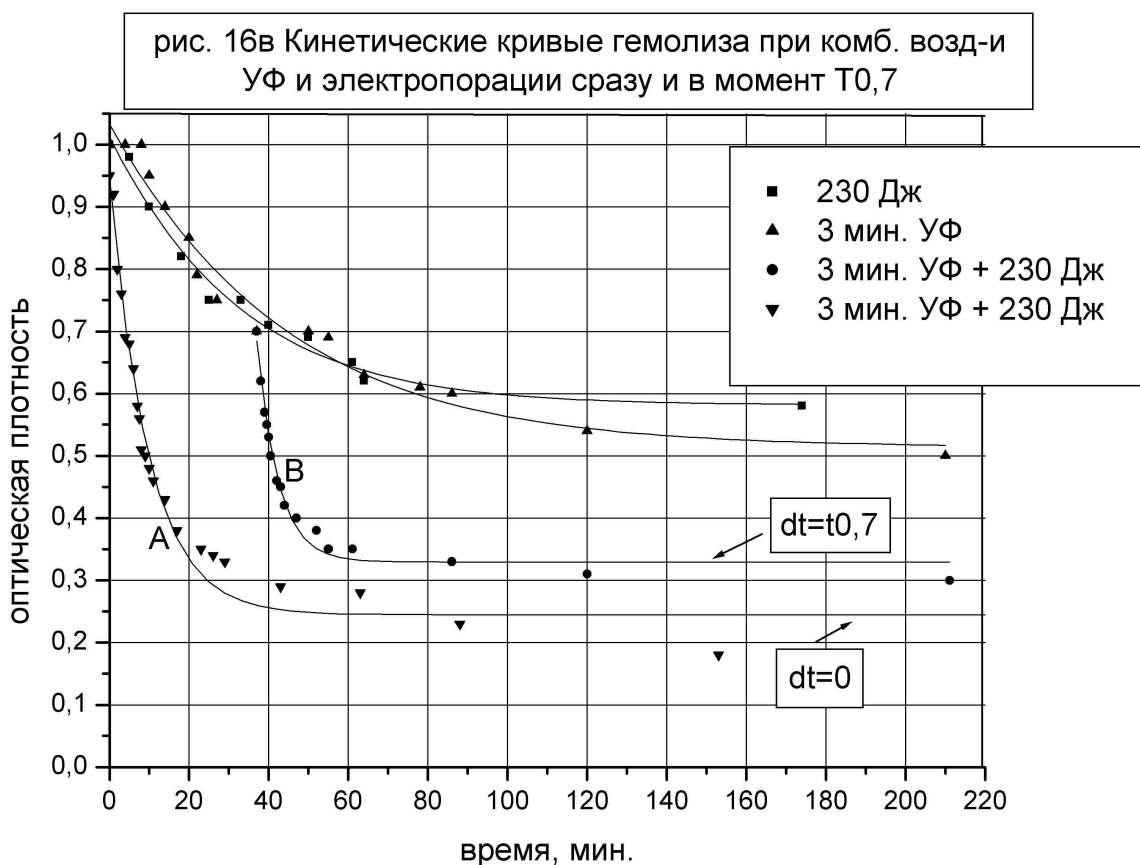
На рис.16б отражено влияние температуры суспензии на характерные параметры кинетических кривых.



*Рис.16б Зависимость характерного времени гемолиза (по уровню 0,7) от времени воздействия УФ излучением (0-120сек) в результате комбинированного воздействия УФ излучением и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230Дж$ ). Кривые получены для разных комнатных температур (16,22С).*

Видно, что при повышении температуры существенно уменьшается доза, при которой резко усиливается эффект комбинированного воздействия на систему. Так при температуре суспензии 16°C это время составляет 1 минуту, в то время как при 22°C оно составляет 5с. Из этого рисунка видно, что  $T_{0,7}$  увеличивается при повышении температуры создания суспензии. Такая повышенная стойкость к электропорации возможно связана с большей стойкостью эритроцитов в целом, когда температура физиологического раствора приближается к 37°C, что проявляется и в больших временах жизни контрольной суспензии, что уже отмечалось ранее.

До сих пор речь шла о действии импульсного электрического поля сразу после облучения (интервал времени примерно 30сек. – 1мин.). В свою очередь на рис.16в представлены соответствующие кинетические кривые, когда электропорация проводилась в момент времени, когда облученная суспензия вышла на уровень 0,7 от первоначального. Видно, что характер кривой гемолиза (б) соответствует кривой (а), с учетом уменьшения начального количества эритроцитов и их состояния к данному моменту. Надо также отметить, что данный эксперимент проводился на другой УФ лампе, излучение которой нагревает суспензию с 22°C до 26°C.



*Рис.16в Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия УФ излучением (время облучения 3 мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230$ Дж) сразу после облучения и в момент выхода суспензии на уровень 0,7.*

Представляется интересным наблюдение за ходом кинетических кривых в течение достаточно *длительного* промежутка времени, сравнимого со временем гемолиза контрольной суспензии эритроцитов, не подвергающейся действию УФ и электропорации. На рис.17а приведены соответствующие кривые для различных суспензий, за которыми наблюдали более 10 дней при температуре суспензии 22°C:

-контрольная

-УФ 2 мин

-электропорация 230 Дж

-комбинация облучения УФ (2 мин) и электропорация электрическим импульсом с энергией 230 Дж.

На рис.17б приведены аналогичные кривые, за которыми наблюдали 7 дней при температуре суспензии 18°C. На рис.17а,б представлены аналогичные случаи, но различаются они характерным временем гемолиза (рис.11а,б).

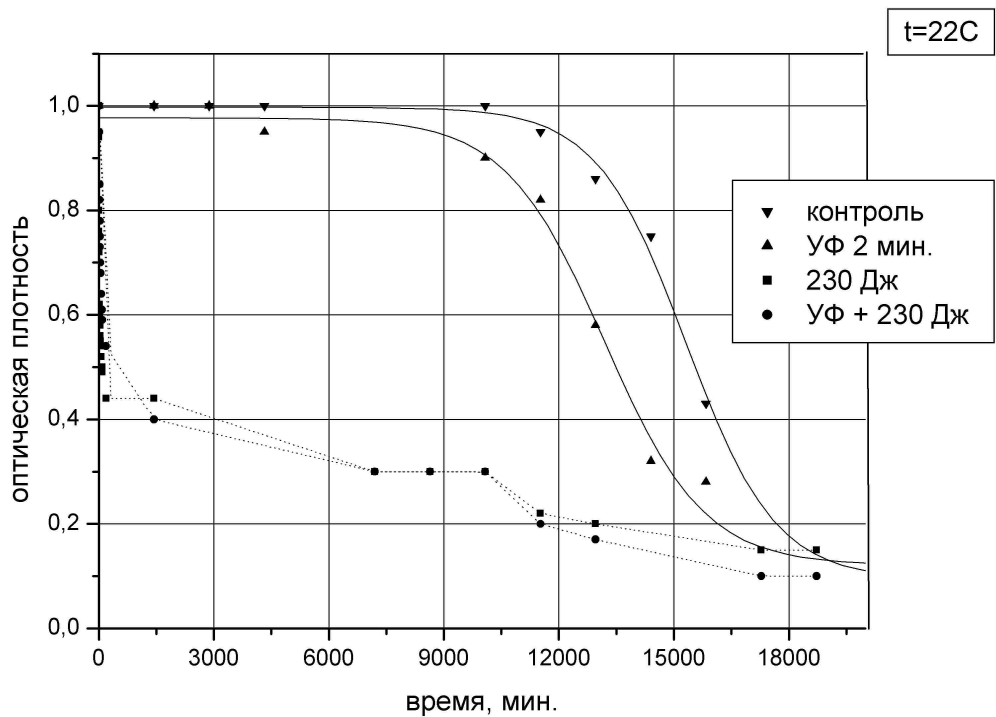


Рис.17а Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия УФ излучением (время облучения 2 мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) в течение 18000 мин при комнатной температуре 22С.

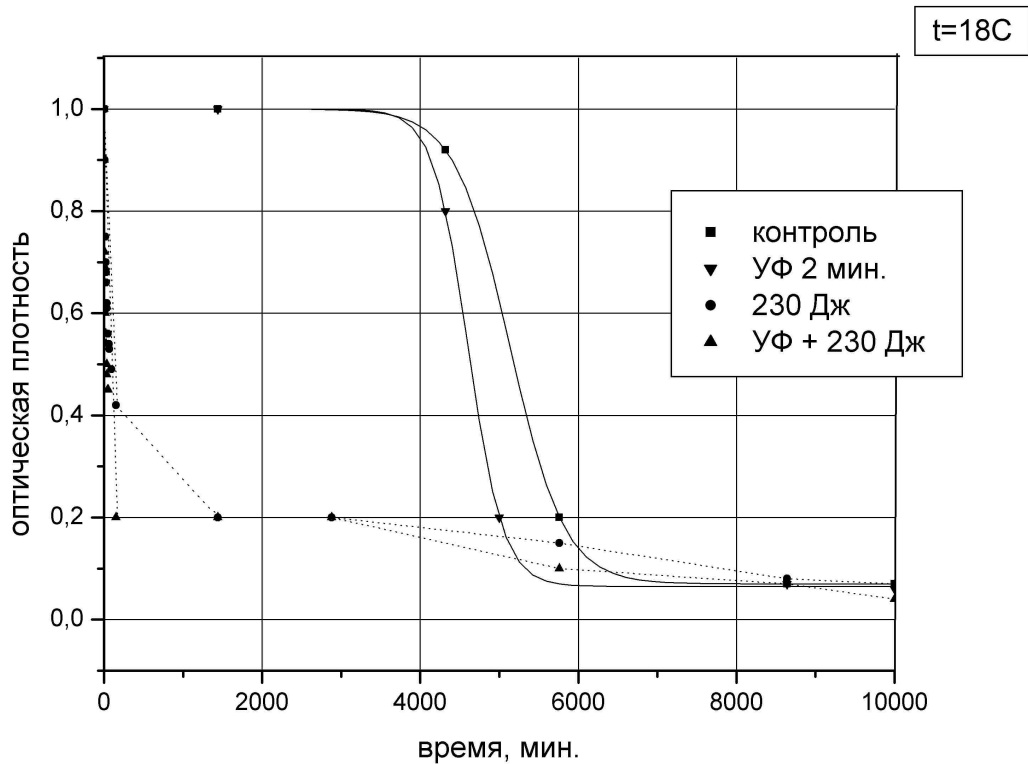


Рис.17б Кинетические кривые в результате комбинированного воздействия УФ излучением (время облучения 2 мин) и импульсным электрическим полем (энергия импульса  $E=230\text{Дж}$ ) в течение 1000 мин при комнатной температуре 18С.

В целом же ход кривых сохраняется. Из рис.17а,б видно, что при 230 Дж и УФ и 230 Дж эритроциты сначала резко гемолизуются, но не все. После этого оставшиеся эритроциты гемолизуются так, как будто бы никакого воздействия не было. Т.е. сначала скорость гемолиза больше, чем у контрольной суспензии, затем скорость гемолиза почти равна скорости гемолиза контрольной суспензии (или облученной УФ соответственно), которая через некоторое время резко увеличивается в соответствии с сигмоидальной кривой гемолиза контрольной суспензии, что приводит к перелому на кривой комбинированного воздействия.

## Основные выводы

На основе полученных экспериментальных данных можно сделать следующие выводы:

1. При электропорации с помощью импульсного электрического поля эритроцитов в суспензии, предварительно облученной пучком ускоренных электронов, скорость гемолиза в первые 40-80 минут больше суммы скоростей гемолиза при воздействии пучком ускоренных электронов и импульсным электрическим полем по отдельности

$$V_{e+E} > V_e + V_E.$$

2. При электропорации с помощью импульсного электрического поля эритроцитов в суспензии, предварительно облученной УФ, скорость гемолиза в первые 40-80 минут больше суммы скоростей гемолиза при воздействии УФ излучения и импульсного электрического поля по отдельности

$$V_{УФ+E} > V_{УФ} + V_E.$$

3. Наблюдается уменьшение порога активного развития гемолиза при комбинированном воздействии пучка ускоренных электронов и ИЭП (тоже в случае с УФ излучением) уменьшается по сравнению с порогом гемолиза в результате действия ИЭП.

4. Скорость «быстрого» гемолиза при комбинированном воздействии нелинейно возрастает в первые 40-60 минут с увеличением энергии электрического импульса.

5. Скорость «быстрого» гемолиза при комбинированном воздействии нелинейно возрастает в первые 40-60 минут с увеличением дозы облучения (времени облучения).

6. Вид кривых при временах наблюдения более 1000 минут в результате комбинированного действия пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля, а также УФ излучения и импульсного электрического поля на суспензию указывает на разделение процесса на две составляющие – фаза «быстрого» и фаза «медленного» гемолиза. Быстрый гемолиз происходит у эритроцитов, сильно поврежденных при внешнем воздействии. Слабо поврежденные эритроциты участвуют в медленной фазе гемолиза и их доля определяет уровень «плато» на кинетических кривых гемолиза.

Также установлено, что при комбинированном воздействии:

а) На характерное время гемолиза влияет время нахождения эритроцитов в физиологическом растворе к моменту воздействия физических факторов.

б) На скорость гемолиза влияет температура суспензии.

Комбинированное воздействие пучка ускоренных электронов и импульсного электрического поля на биологическую мембрану представляет научный интерес, в частности, как проблема анализов нелинейного отклика системы на совокупность разнородных воздействий.

Кроме того, данное направление исследования представляет интерес в связи с проблемой воздействия  $\gamma$ -облучения на кровь для предотвращения патологий при пересадке костного мозга [7], а также для стерилизации суспензии [8]. Гемолиз в условиях комбинированного воздействия может быть использован для создания биологических детекторов дозы ионизирующего излучения [9]. Особенно важным это может оказаться при измерении больших доз.

Структурные нарушения мембран эритроцитов и капиллярной стенки при действии на ткани ионизирующего излучения и импульсного электрического поля может привести к нарушению фильтрационно-реабсорбционного равновесия и диффузионно-фильтрационного синергизма. В результате это может вызвать локальную гипоксию [10].

Авторы выражают благодарность доктору ф.-м.н., профессору Ишханову Б.С. за совместное проведение экспериментов в НИИЯФ им. Д.В. Скобельцына.

## Литература

1. V.I. Shvedunov, A.I. Karev, V.N. Melenkin, N.P. Sobenin, W.P. Trower. Improved mobile 70 MeV Race-Track Microtron. EPAC 1995.
2. Козлова Е.К., Фомина У.А., Черняев А.П., Черныш А.М. Влияние пучка ускоренных электронов на кинетику гемолиза эритроцитов. Медицинская физика, №2, 2002.
3. Козлова Е.К., Черняев А.П., Фомина У.А., Алексеева П.Ю., Горбунов П.В., Черныш А.М. Влияние ионизирующего излучения (пучок ускоренных электронов и УФ излучение) на кинетику гемолиза эритроцитов. Препринт НИИЯФ МГУ-2002023/707.
4. Neamtu S., Morariu V.V., Turcu I., Popescu A.H., Copaescu L.I. Pore resealing inactivation in electroporated erythrocyte membrane irradiated with electrons.
5. Grossweiner L.I. Photosensitization of red blood cell hemolysis. [www.photobiology.com](http://www.photobiology.com).
6. Grossweiner L.I. Ionization radiation. [www.photobiology.com](http://www.photobiology.com).
7. Mintz P.D., Anderson G. Effect of gamma irradiation on the in vivo recovery of stored red blood cells. [www.medline.com](http://www.medline.com).
8. Stensrud G., Passi S., Larsen T., Sandset P.M., Smistad G., Monkkonen J., Karlsen J. Toxicity of gamma irradiation liposomes. In vitro interaction with blood components. [www.medline.com](http://www.medline.com).
9. Benderitter M., Vincent-Genod L., Berroud A., Muller S., Donner M., Voisin P. Radio-induced structural membrane modifications- a potential bioindicator of ionizing radiation exposure? [www.medline.com](http://www.medline.com).
10. Козлова Е.К., Черняев А.П., Фомина У.А., Черныш А.М. Моделирование влияния ионизирующего излучения на кинетику процессов в мембранных структурах (капилляр, нерв). Препринт НИИЯФ МГУ-2001-30/670.

**Елена Карловна Козлова  
Александр Петрович Черняев  
Василий Иванович Шведун  
Александр Михайлович Черныш  
Ульяна Александровна Фомина  
Антон Сергеевич Шаракшанэ  
Полина Юрьевна Алексеева  
Петр Владимирович Горбунов  
Андрей Николаевич Ермаков**

**Комбинированное действие пучка ускоренных электронов и импульсного  
электрического поля на биологическую мембрану**

Препринт НИИЯФ МГУ-2002-29/713

Работа поступила в ОНТИ 15.12.2002 г.

**ИД № 00545 от 06.12.1999**

**Издательский отдел  
Учебно-научного центра довузовского образования**

117246, Москва, ул. Обручева, 55А  
119992, Москва, Ленинские горы, ГЗ МГУ, Ж-105а  
Тел./факс (095) 718-6966, 939-3934  
e-mail: [izdat@abiturcenter.ru](mailto:izdat@abiturcenter.ru)  
<http://www.abiturcenter.ru>

Гигиенический сертификат №77.99.2.925.П.9139.2.00 от 24.02.2000  
Налоговые льготы - Общероссийский классификатор продукции  
ОК-005-93, том 1-953000

Заказное. Подписано в печать 23.12.2002г. Формат 60x90/16  
Бумага офсетная № 2. Усл. Печ. л. 1,94  
Тираж 50 экз. Заказ №

Отпечатано в Мини-типографии УНЦ ДО