

На правах рукописи

Власова Ольга Леонардовна

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ПАРАМЕТРИЧЕСКИЕ ОПТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ  
ОПРЕДЕЛЕНИЯ СОСТОЯНИЙ ВОДНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ  
ДИСПЕРСНЫХ СИСТЕМ

03.01.02 — биофизика

А в т о р е ф е р а т  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук

Санкт-Петербург – 2011

Работа выполнена в государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Санкт-Петербургский государственный политехнический университет»

Научный консультант: доктор химических наук, профессор,  
член-корреспондент РАН  
Панарин Евгений Фёдорович

Официальные оппоненты: доктор физико-математических наук,  
Олейников Владимир Александрович

доктор биологических наук,  
старший научный сотрудник  
Рожков Сергей Павлович

доктор физико-математических наук,  
профессор  
Фотиади Александр Эпаминондович

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук Институт  
аналитического приборостроения РАН

Защита состоится 30 июня 2011 года в 14 часов на заседании диссертационного  
совета Д 212.229.25 при ГОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный  
политехнический университет» по адресу: 195 251, Санкт-Петербург, ул.  
Политехническая, д.29.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО СПбГПУ

Автореферат разослан «        » мая 2011 года

И.о. ученого секретаря  
диссертационного совета,  
д.т.н.

Тимофеев А.Н.

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

Водные биологические дисперсные системы или биодисперсии (БДС) — широко распространённые в природе биообъекты, дисперсная фаза которых представлена нано- и микрочастицами биологического происхождения (например, белками и другими биополимерами, их ассоциатами и агрегатам, вирусами, клетками и т. п.), а дисперсионной средой является вода или (чаще) водные растворы электролитов. В частности, к БДС относятся все биологические жидкости человека и животных, а также многочисленные природные среды. Состояние любой БДС, являющейся в принципе гетерогенной системой, как правило, поликомпонентной и полимодальной, в каждый данный момент времени характеризуется совокупностью качественных и количественных показателей — параметров состояния.

Особенностью водных биологических дисперсий является многочисленность параметров их состояния, нестабильность состояния во времени и при изменении физико-химических условий. В оптике дисперсных сред такие системы принято классифицировать как «плохо определённые», для которых расчёты на основании теории Ми затруднены неопределённостью размеров, формы, числа частиц и их относительного показателя преломления.

С такими системами приходится сталкиваться как в ходе проведения фундаментальных биофизических исследований, так и в практической сфере — биотехнологии, экологии, медицине. Сложность и изменчивость структуры БДС и взаимодействий между их компонентами обуславливает необходимость контроля в режиме реального времени («on-line») и регулирования их состояния по принципу обратной связи. При этом для фармацевтических, медицинских и биотехнологических процессов чаще всего важно не знание, например, абсолютных размеров частиц и их ассоциатов, а определение в целом состояния системы — стабильности или динамики его изменения. Для примера можно привести контроль агрегативной устойчивости биодисперсий в процессе лиофильной сушки, что является важным условием сохранения биологической активности частиц в лекарственных препаратах, и контроль кинетики и условий

осаждения примесных белков из культуральных жидкостей, содержащих целевой продукт.

Перечисленные задачи должны решаться с помощью простых, надежных, не разрушающих, доступных, но при этом высокоинформативных методов анализа. К их числу можно отнести спектральные методы, реализуемые в оптическом диапазоне длин волн.

В биофизике чаще всего изучают только отдельные уровни организации дисперсной фазы БДС. Кроме того, традиционно применяемое математическое моделирование структуры этих образований, как правило, практически не учитывает взаимодействия частиц со сложной дисперсионной средой и, тем более, с другими компонентами дисперсной фазы.

В последнее время всё больше надежд (в связи с развитием лазерных технологий) при исследовании БДС возлагают на измерения параметров светорассеяния одиночных частиц. Однако в данном случае также возникают проблемы, связанные с искажением информации из-за различий в ориентации частиц в потоке.

Целый ряд подходов в изучении и оценке параметров состояний БДС основан на решении так называемой «обратной оптической задачи», то есть на определении свойств изучаемых объектов по полученным экспериментальным результатам измерений. В применяемых для этого теоретических расчётах используются различные приближения, привлекаются дополнительные условия вместе с ограничениями в постановке задачи, т. е. производится «регуляризация». В итоге в большинстве случаев решение получается весьма приближенным, так как основано на конкретной аппроксимации, выход за пределы которой может привести к значительным ошибкам и неадекватной интерпретации полученных данных. Из-за большого разнообразия оптических констант БДС использование «регуляризационных» методов не позволяет решать для таких систем обратные задачи в полном объеме, а сложные и длительные вычисления не обеспечивают быстрого получения информации и возможности контроля в режиме реального времени.

Таким образом, для БДС, которые относятся к «плохо определённым» системам, в настоящее время отсутствуют универсальные простые адекватные методы контроля on-line их состояний. Поэтому, с учетом широкой

распространенности водных биологических дисперсных систем и значимости их для ряда био- и медицинских технологий, создание методов определения состояний таких систем является актуальной задачей.

### **Цели и задачи работы**

Цель работы: создать экспериментально-параметрические оптические методы определения состояний водных биологических дисперсий без «регуляризации» и разработать универсальный алгоритм получения информативных параметров для сравнительного анализа биодисперсий в режиме реального времени.

**Для достижения поставленной цели было необходимо решить следующие научные задачи:**

1. Провести анализ возможностей традиционных «регуляризационных» методов решения прямой и обратной оптической задачи для модельных водных дисперсий анизодиаметрических частиц (как однокомпонентных, так и бикомпонентных).
2. Для реальных сложных (поликомпонентных и полимодальных) водных биологических дисперсий обосновать многопараметрический подход, включающий проведение параллельных измерений с помощью различных оптических методов и определение информативных параметров для экспресс-диагностики таких систем.
3. Разработать алгоритм получения расчётных параметров, информативных для определения и сравнения состояний водных биологических дисперсий в режиме реального времени и не требующих применения регуляризационных методов.
4. Доказать универсальность разработанного алгоритма при проведении сравнительного анализа состояния ряда модельных и природных водных биологических дисперсных систем, различающихся по сложности структуры и состава.

### **Объекты экспериментального исследования**

- Водные дисперсии бычьего сывороточного альбумина — БСА (молекулярная масса (ММ) ~ 70 кДа) разной степени очистки (производства фирмы «Fluka Chemical Corp.», Швейцария и «Реахим»)

Россия) и яичного альбумина — ЯА (ММ ~ 40 кДа) производства «Реахим»;

- Дисперсии клеток кишечной палочки (*E. coli*) в водной питательной среде;
- Плазма крови белых беспородных крыс;
- Водные дисперсии гомогенатов мышечной ткани белых беспородных крыс контрольных групп и животных с перевитой в область бедра клеточной культурой лимфосаркомы Плисса;
- Новые водорастворимые полимеры, синтезированные в лаборатории гидрофильных полимеров Института высокомолекулярных соединений РАН (зав. лаб., член-корр. РАН, проф. Панарин Е.Ф.);
- Фотосенсибилизатор (ФС) радахлорин (РХ), представляющий собой модифицированную природную смесь хлоринов из микроводоросли рода *Spirulina*, около 70–90% которых составляет хлорин е<sub>6</sub>.

#### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Экспериментально определяемые различными оптическими методами параметры первого класса, характеризующие взаимодействие света с водными биологическими дисперсиями, и рассчитанные на их основе параметры второго класса образуют параметрическое дву- и многомерное множество, информативное для анализа состояний этих дисперсий без применения «регуляризации».
2. Получаемые с помощью разработанного алгоритма параметры второго класса позволяют определять состояние водных биологических дисперсий и проводить их сравнительный анализ в режиме реального времени.
3. Универсальность такого экспериментально-параметрического подхода доказывается результатами сравнительного анализа состояний водных биологических дисперсных систем, различающихся по сложности структуры и состава.

#### **Научная новизна работы**

- Впервые созданы экспериментально-параметрические оптические методы определения состояний водных биологических дисперсий;

- Впервые предложен алгоритм экспериментально-параметрического определения состояний водных биологических дисперсий для их сравнительного анализа в режиме реального времени;
- Для серии модельных и природных водных биологических дисперсных систем, различающихся по сложности структуры и состава, на основе использования результатов анализа поглощения и рассеяния (упругого интегрального и дифференциального, в том числе с учётом поляризации) впервые показана принципиальная возможность применения предложенного алгоритма, в каждой серии экспериментов определены информативные параметры;
- Впервые с помощью экспериментально-параметрических оптических методов определения состояний водных биологических дисперсий проведён сравнительный анализ состояния серии биодисперсий нано- и микрочастиц, как рассеивающих, так и поглощающих свет оптического диапазона.

#### **Научно-практическая значимость работы**

Разработанный алгоритм экспериментально-параметрического оптического определения состояний водных биологических дисперсий для их сравнительного анализа в режиме реального времени может быть положен в основу новых оптических технологий мониторинга процессов, происходящих в БДС. Это позволит не только осуществлять контроль таких процессов, но и управлять ими по системе обратной связи в биотехнологии, медицине, экологии. Как показали результаты исследований, проведённых в диссертационной работе, алгоритм является универсальным и может быть с успехом использован для анализа водных полидисперсных полимодальных поликомпонентных биодисперсий. Полученные результаты были использованы на практике и позволили определить оптимальные условия селективной флокуляции примесных белков в культуральной жидкости, содержащей противоопухолевый антрациклиновый антибиотик рубомицин.

#### **Апробация работы**

Результаты диссертационной работы докладывались на: XI European Conference Chemistry of Interfaces. 1990. Berlin, IV Пушинском совещании «Культивирование клеток животных и человека. Проблемы цитотехнологии». 1999, II (1999) и III (2004) Съездах Биофизиков России, 4-th Conference on Electromagnetic and Light scattering by Nonspherical Particles. Theory and Applications. 1999,

Международной конференции «Информационные и бизнес-технологии XXI века (IBT-XXI)» 1999, 10th International Conference on Colloid and Interface Science. 2000. Bristol. United Kingdom, XVI Conference of the European Colloid and Interface Society. Paris. 2002, International Conference «Electrostatics» (as part of The Physics Congress). Edinburgh. 2003, Международной конференции «Современные проблемы науки о полимерах». СПб. 2006, Международной конференции «Медбиотек-3». 2006, 25<sup>th</sup> DECHEMA annual convention of biotechnologists «European BioPerspectives». Köln. 2007, XIV международной научно-практической конференции «Современные техника и технологии». Томск. 2008, 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis. Zurich. 2008, International Conference «Nanotech Northern Europe». Copenhagen. 2008, 13 th International Workshop NDTCS-2009. Vilnius 2009, а также неоднократно на: Внутривузовской конференции «Научные исследования и инновационная деятельность», Международных научно-методических конференциях «Высокие интеллектуальные технологии и инновации в образовательно-научной деятельности» и «Фундаментальные исследования в технических университетах», Международной научно-практической конференции «Измерительные информационные технологии и приборы в охране здоровья (Метромед)», Международных научных конференциях «Лазеры, измерения, информация» и «Лазеры для медицины, биологии и экологии».

#### **Публикации и личный вклад автора**

Основные результаты диссертации отражены в 63 печатных работах, включающих 22 статьи (в том числе: 12 в журналах из перечня ВАК, 4 статьи в сборниках международных конференций), 1 авторское свидетельство и 1 патент РФ, а также 1 монографию.

Вся экспериментальная часть работы выполнена лично автором или под его непосредственным руководством, все разработки, представленные в диссертации, принадлежат автору. Соавторы по каждой части работы подробно представлены в списке публикаций.

#### **Структура и объём диссертации**

Диссертация состоит из введения, семи глав, заключения и списка цитируемой литературы. Объём диссертации составляет 223 страницы, включая 61



рисунок и 18 таблиц. В списке цитируемой литературы представлено 215 наименований.

**Работа выполнена при финансовой поддержке:** Федеральной целевой программы «Федерально-региональная политика в науке и образовании» (проект «Разработка и создание новых технологий фотодинамической терапии злокачественных опухолей») 2002-2004гг.; Фонда содействия развития малых форм предприятий в научно-технической сфере в рамках Программы «Старт» 2006 г. (проект «Синтез и изучение взаимодействия растворимых катионных полиэлектролитов с компонентами биологических жидкостей»), Гранта Комитета по науке и высшей школы при Правительстве Санкт-Петербурга для физических лиц 2009 г. (проект «Многопараметрический подход к оптическому анализу параметров состояния модельных и природных водных дисперсий»).

### **Содержание работы**

Во **Введении** обоснована актуальность темы, новизна и практическая значимость работы, поставлена цель и задачи диссертации, сформулированы основные положения, выносимые на защиту.

**Глава 1 «Обзор литературы»** включает информацию о постановке обратных оптических задач, о современных теориях и методах их решения, о принципах выбора модельных систем, о специфике выбранных для исследования в данной диссертации модельных и природных биодисперсий.

**Глава 2 «Объекты и методы исследования».** В ней описаны используемые в экспериментах оптические методы анализа, а именно: рефрактометрия, спектрофотометрия, нефелометрия, спектрофлуориметрия. Дана характеристика стандартной измерительной аппаратуры. Эксперименты выполнены с использованием рефрактометра типа Аббе (ИРФ — 454Б2М) ; однолучевого спектрофотометра СФ-46 (ЛОМО) с рабочим диапазоном длин волн 190-1100 нм и варьируемым с помощью диафрагм апертурным углом фотоприёмника (от  $20'$  до  $4^0$ ); нефелометра (установка собрана сотрудником кафедры «Биофизика» СПбГПУ Паршиным А.В.) с источником линейно поляризованного света (гелий-неоновый лазер с  $\lambda = 632,8$  нм) и рабочим диапазоном углов  $90^0 \pm 30^0$ , апертурным углом фотоприёмника  $2^0$ ; спектрофлуориметра «Флюорат-02-Панорама» (ООО «Люмэкс», Санкт-Петербург).

В Главе 3 «Экспериментально-параметрические оптические методы определения состояния водных биологических дисперсных систем для их сравнительного анализа» показано, что водные биологические дисперсии представляют собой, как правило, полидисперсные полимодальные поликомпонентные системы. Значения параметров состояния, характеризующих каждую моду, могут быть различны. Например, на рис.1 схематично представлена

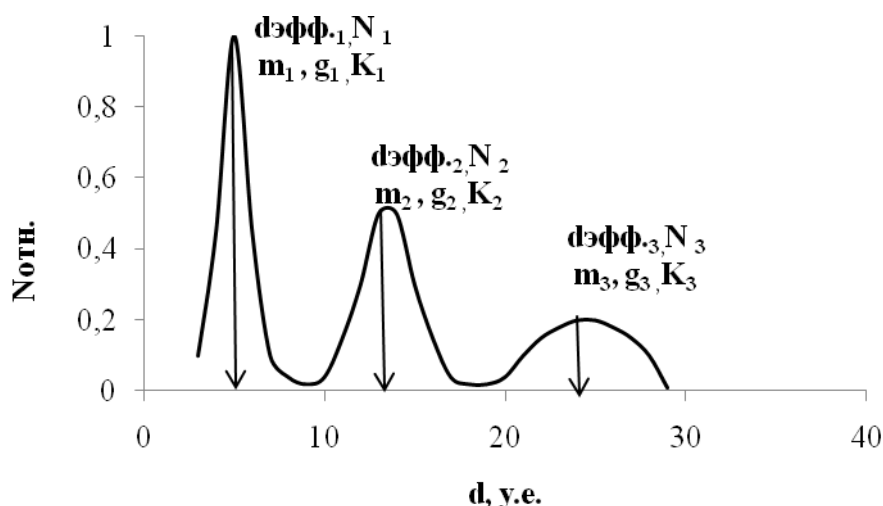


Рисунок 1. Схематическое представление полидисперсной полимодальной поликомпонентной дисперсной системы.  $N_{отн.}$  — относительное к максимальному из всех мод среднему значению числа частиц.

бикомпонентная тримодальная полидисперсная система, две моды которой характеризуют два вида частиц (например, клетки и сорбент), а третья — частицы смешанного типа. Каждая мода имеет соответствующие средние значения: эффективного диаметра  $d_{эфф.}$ , числа частиц  $N$ , показателя преломления (при наличии поглощения  $\tilde{m}$  — комплексный), удельной мутности  $g$ , коэффициента рассеяния  $K$  и т.д. В условиях априорной неопределённости достаточно сложно интерпретировать данную систему подбором адекватной математической модели. Модельные эксперименты по решению прямых и обратных оптических задач были выполнены с водными дисперсиями анизодиаметрических частиц, как однокомпонентными: а) клетки *E.coli* — вытянутые эллипсоиды (фактор формы 3), б) частицы природного сорбента каолинита — сплюснутые эллипсоиды (фактор формы 7), так и бикомпонентными — смесь клеток с каолинитом.

Сложность структуры и состава данных модельных систем была подтверждена экспериментально. Для дисперсии клеток *E.coli* в питательной среде, находящихся в экспоненциальной фазе роста (рис. 2), было получено бимодальное распределение частиц дисперсной фазы по размерам (методика приведена в авторском свидетельстве).

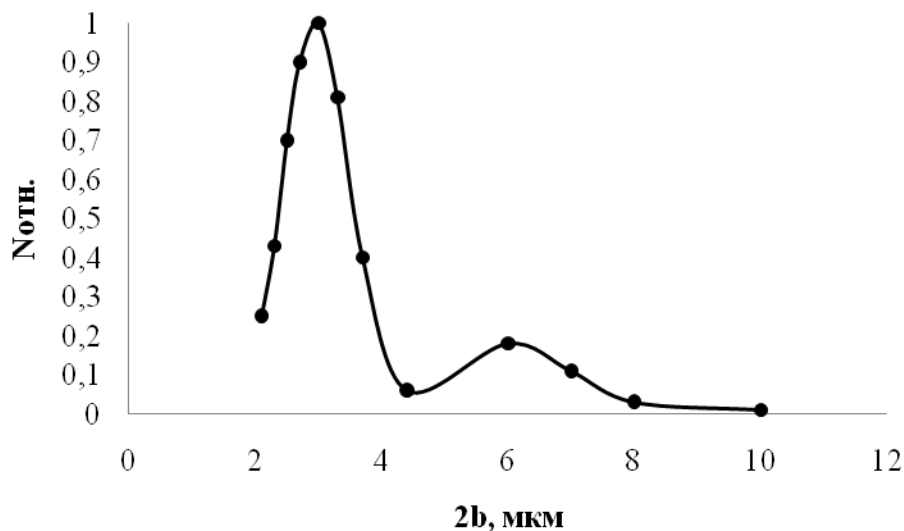


Рисунок 2. Экспериментально полученное распределение частиц по размерам для дисперсии клеток *E.coli* (штамм АВ 1157) в экспоненциальной фазе роста.  $2b$  — размер большой оси эллипсоида.  $N_{отн.}$  — относительно к максимальному из всех мод среднему значению числа частиц.

Распределения частиц дисперсной фазы по размерам, полученные по данным разных методов для водных дисперсий каолинита, представлены на рис.3. Результаты исследований показали, что в силу присущих каждому методу ограничений, сложно получить одинаковые по виду распределения частиц по размерам (данные методов дополняют друг друга). Хорошее совпадение наблюдалось для данных метода спектротурбидиметрии в сочетании с седиментацией и метода динамического светорассеяния.

Рис. 4 демонстрирует бимодальное распределение частиц по электрофоретической подвижности (данные микроэлектрофореза) в бикомпонентных системах.

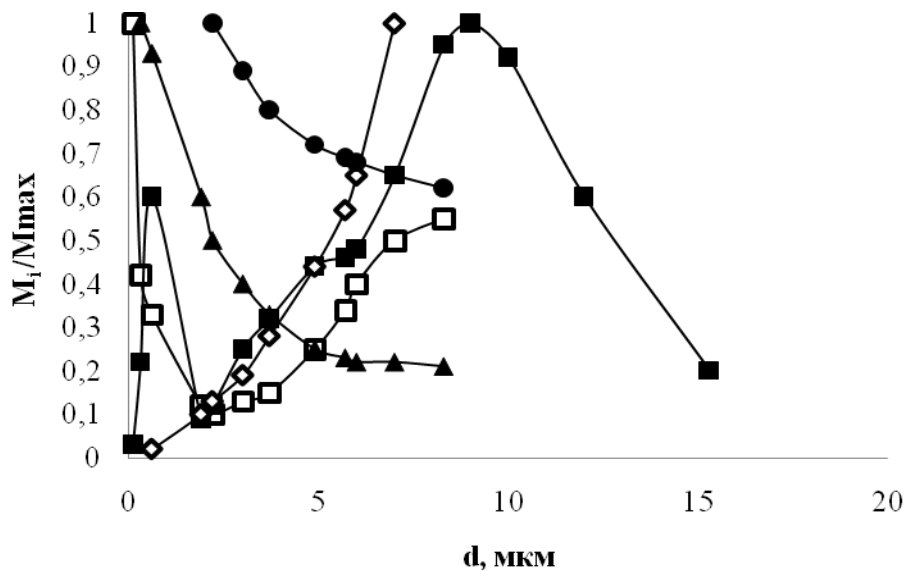


Рисунок 3. Распределения частиц по размерам, полученные по данным различных методов:  $\square$  — сочетание спектрофотометрии и седиментации (авторское свидетельство),  $\blacksquare$  — динамическое рассеяние света,  $\blacktriangle$  — седиментационный анализ,  $\diamond$  — световая микроскопия,  $\bullet$  — счётчик Коултера.  $M_i$  — масса частиц со средним диаметром  $d_i$ ,  $M_{\max}$  — максимальная масса частиц из всех частиц со средним диаметром  $d_i$ .

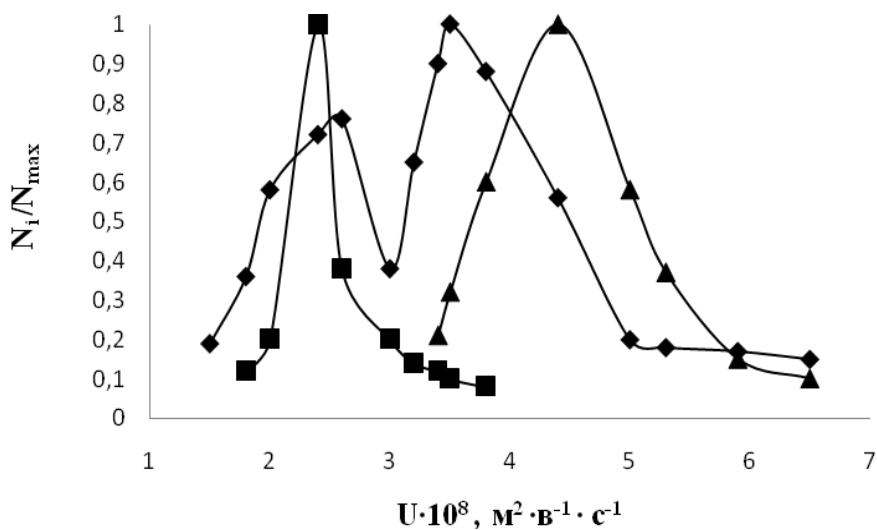


Рисунок 4. Распределение частиц дисперсных систем по электрофоретической подвижности (данные микроэлектрофореза):  $\blacksquare$  — водная дисперсия каолинита,  $\blacktriangle$  — дисперсия клеток *E.coli* (штамм АВ 1157),  $\blacklozenge$  — смешанная дисперсия в исходных концентрациях.  $N_i$  — число частиц с подвижностью  $U_i$ ,  $N_{\max}$  — максимальное число частиц из всех частиц с подвижностью  $U_i$ .

Использование при решении обратных задач светорассеяния априорной модели (независимые рассеиватели) в случае взаимодействия частиц в

бикомпонентных системах (клетки + каолинит) приводило к расхождению экспериментальных данных и результатов расчётов (см., например, рис.5).

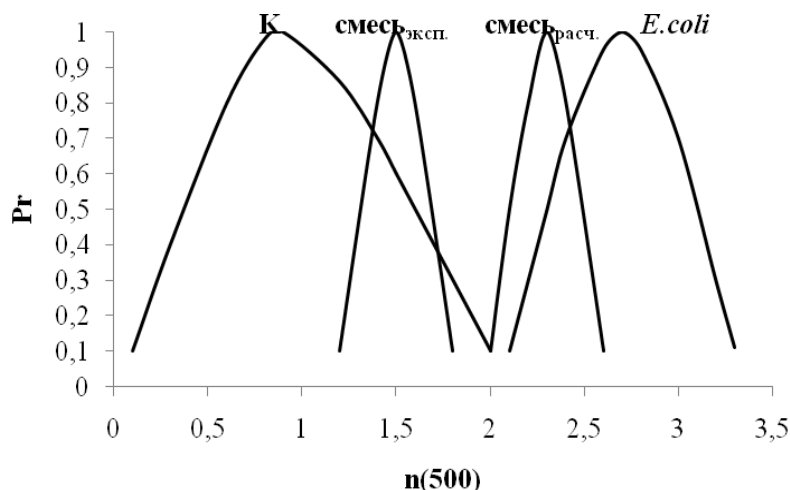


Рисунок 5. Сравнение экспериментальных данных (смесь<sub>эксп.</sub>) с расчётами (смесь<sub>расч.</sub>) в приближении независимых рассеивателей для смешанных дисперсных систем клеток кишечной палочки (*E.coli*, штамм 803-8) и каолинита (К) в случае, когда между частицами сорбента и клетками есть взаимодействие.  $n(500)$  — волновой экспонент,  $P_r$  — вероятность.

Результаты экспериментов с модельными водными биологическими дисперсиями показали: 1) разные методы анализа, в том числе «невозмущающие» оптические, дают различную взаимодополняющую информацию, но ни один из них не является абсолютным; 2) решение прямых и обратных оптических задач с регуляризацией может приводить к расхождению расчётных и экспериментальных данных; 3) многопараметрический подход, включающий не только измерения интегрального ослабления света, но и спектров флуоресценции, дифференциального статического и динамического светорассеяния для набора углов, является одним из путей повышения информативности оптических методов для экспресс-диагностики сложных дисперсных систем (аналогия — известный в математике принцип соответствия числа уравнений и числа неизвестных). При таком подходе полидисперсность и полимодальность не является препятствием для решения задач классификации состояния дисперсных систем; 4) для анализа состояния рассеивающих свет БДС информативными могут быть, например, следующие параметры: волновой экспонент для разных спектральных интервалов  $n(\lambda_{cp})$ , определённый при разных углах апертуры фотоприёмника  $\gamma$  (спектроскопия интегрального ослабления света), различные параметры диссимметрии

индикатрисы при разных углах рассеяния  $I(\theta_1)/I(\theta_2)$  и при разной поляризации падающего света (спектроскопия дифференциального светорассеяния).

На базе этих результатов в диссертационной работе созданы экспериментально-параметрические оптические методы определения состояния водных биологических дисперсных систем, основанные на получении параметров двух классов:

- **Первый класс параметров — измеряемые в экспериментах параметры** для биодисперсий с определённым состоянием

$$S_i(c_i, d_{эфф.i}, N_i, g_i, K_i, \tilde{m}_i),$$

где  $c_i$  — концентрация,  $d_{эфф.i}$  — эффективный диаметр,  $N_i$  — число частиц,  $g_i$  — удельная мутность,  $K_i$  — коэффициент рассеяния,  $\tilde{m}_i$  — показатель преломления,

$$S_i \in S, \text{ где } i = 1, 2, 3, \dots, k,$$

такие как оптическая плотность, интенсивность светорассеяния, флуоресценции

$$p_{i,s_i} = f(c_i, d_{эфф.i}, N_i, g_i, K_i, \tilde{m}_i)$$

$$p_{i,s_i} \in p, \text{ где } i = 1, 2, 3, \dots, k,.$$

Для каждого состояния  $S_i$  имеется свой набор параметров первого класса:

$$p_{1,s_1}, p_{2,s_1}, p_{3,s_1} \dots \dots p_{k,s_1}$$

$$p_{1,s_2}, p_{2,s_2}, p_{3,s_2} \dots \dots p_{k,s_2}$$

$$p_{1,s_3}, p_{2,s_3}, p_{3,s_3} \dots \dots p_{k,s_3}$$

$$\dots \dots \dots$$

$$p_{1,s_k}, p_{2,s_k}, p_{3,s_k} \dots \dots p_{k,s_k}$$

- **Второй класс параметров — расчётные параметры:**

а). полученные с помощью анализа и математической обработки результатов измерений (без какой-либо предварительной информации о характеристиках дисперсной фазы — «безрегуляризационный» метод), например, расчёт волнового экспонента  $n(\lambda_{ср})$ , отношений оптических плотностей, диссимметрий индикатрисы рассеяния и др., комбинированных параметров из разных оптических методов анализа:

$$P_{i,s_i} = f(d_{эфф.i}, N_i, g_i, K_i, \tilde{m}_i)$$

$$P_{i,s_i} \in P, \text{ где } i = 1, 2, 3, \dots, k,.$$

Для каждого состояния  $S_i$  рассчитывается свой набор таких параметров второго класса:

$$\begin{array}{l}
P_{1,S1}, P_{2,S1}, P_{3,S1} \dots \dots P_{k,S1} \\
P_{1,S2}, P_{2,S2}, P_{3,S2} \dots \dots P_{k,S2} \\
P_{1,S3}, P_{2,S3}, P_{3,S3} \dots \dots P_{k,S3} \\
\dots\dots\dots \\
P_{1,Sk}, P_{2,Sk}, P_{3,Sk} \dots \dots P_{k,Sk}
\end{array}$$

б). полученные с помощью анализа и математической обработки результатов измерений при использовании в расчётах определённой модели (решение обратной оптической задачи с «регуляризацией») — распределение частиц дисперсной фазы по размерам,  $d_{эфф.i}$ ,  $N_i$ ,  $\tilde{m}_i$ .

Первый класс параметров не может быть использован для сравнительного анализа состояния биодисперсий, поскольку абсолютная величина параметров, как правило, зависит от концентрации и имеет размерность. Набор параметров второго класса, полученный без предварительной регуляризации, для каждой системы является уникальным и отражает в неявном виде её состояние (параметры состояния): функцию распределения частиц по размерам, показатель преломления, форму и внутреннюю структуру частиц:

$$\begin{array}{l}
P_{1,S1} = f_{1,1}(d_{эфф.i}, N_i, g_i, K_i, \tilde{m}_i) \\
P_{2,S1} = f_{2,1}(d_{эфф.i}, N_i, g_i, K_i, \tilde{m}_i) \\
P_{3,S1} = f_{3,1}(d_{эфф.i}, N_i, g_i, K_i, \tilde{m}_i) \\
\dots\dots\dots \\
P_{k,S1} = f_{k,1}(d_{эфф.i}, N_i, g_i, K_i, \tilde{m}_i)
\end{array}$$

Для успешной реализации экспериментально-параметрических оптических методов определения состояний БДС для их сравнительного анализа в режиме реального времени в каждом конкретном случае достаточно сложной и ответственной задачей является выбор дисперсии сравнения («реперной» дисперсии). Следующим шагом является расчёт набора параметров второго класса для «реперной» дисперсии и определение информативных для каждой конкретной задачи параметров. Затем производится сравнение параметров последующих состояний системы с набором параметров «реперной». Если их различия недостоверны, то делается вывод о высокой вероятности стабильности состояния системы. Если же наборы параметров достоверно различаются (например, согласно U-критерию Манна-Уитни), делается вывод об изменении состояния системы.

Дифференцировать состояния систем можно различными методами, а именно:

1. Статический метод — состояния БДС дифференцируют графически на плоскости параметров второго класса (параметрическое задание состояния):

$$\frac{[P_i, S_i]_{дс}}{[P_i, S_i]_{др}}; \frac{[P_j, S_j]_{дс}}{[P_j, S_j]_{др}}, \text{ где} \quad (1)$$

дс — дисперсии сравнения, др — «реперная» дисперсия

2. Динамический метод — графическое построение

$$\frac{[P_i, S_i]_{tдс}}{[P_i, S_i]_{tдр}} = f(t), \text{ где} \quad (2)$$

tдс — изменение с течением времени параметров дисперсии сравнения,

tдр — изменение с течением времени параметров «реперной» дисперсии.

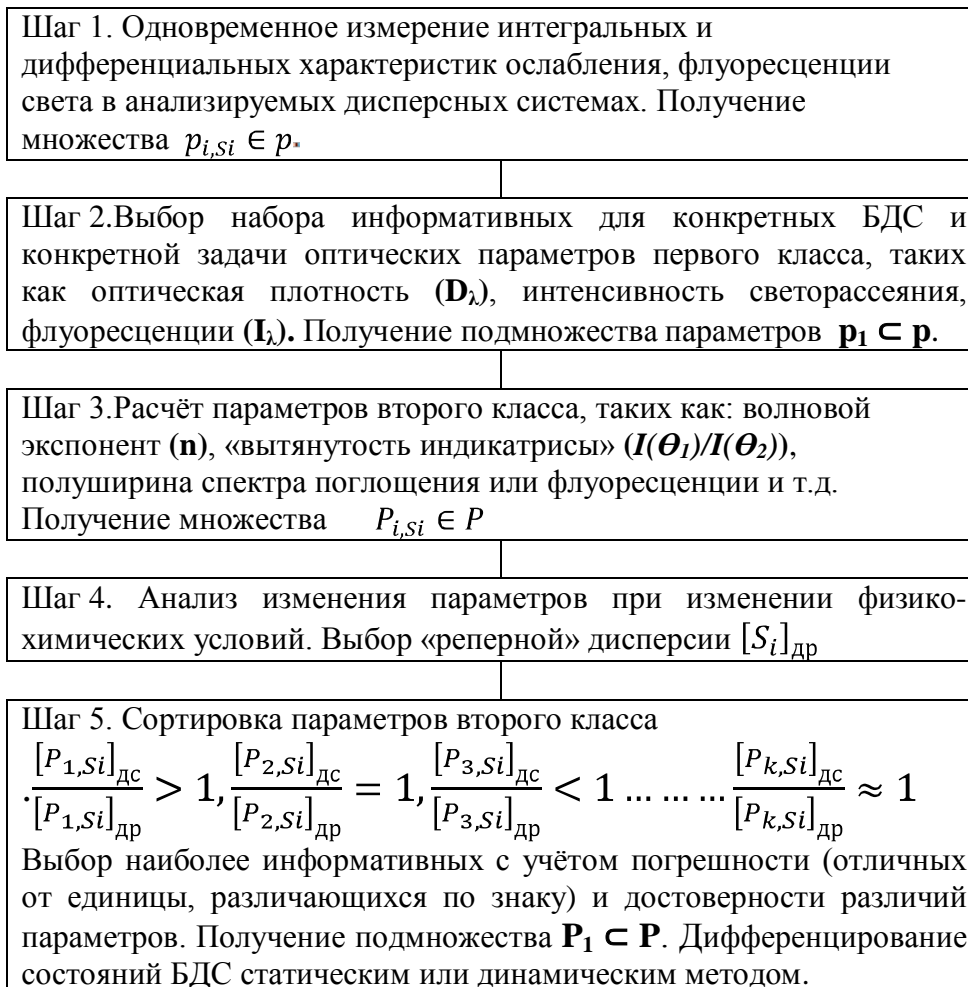
3. Информационно-статистический подход — определение соответствия дискретных качественных состояний с заданными по полученным экспериментальным данным кусочно-непрерывными шкалами количественных значений параметров второго класса.

Следует отметить, что для характеристики каждого изменившегося состояния можно определить «коэффициент изменения» по сравнению с исходным состоянием, а также решить задачу с помощью «регуляризационного» метода, например, методом спектротурбидиметрии (СТ) определить эффективный диаметр частиц.

Для сравнительного анализа состояний БДС с возможной технической реализацией в режиме on-line был разработан следующий



## Алгоритм экспериментально-параметрического определения состояний



В Главе 4 «Сравнительный анализ процессов агрегации в модельных дисперсиях альбумина» представлены результаты применения разработанного алгоритма для сравнительного анализа процессов агрегации частиц в водных белковых дисперсиях (БСА, ЯА). Известно, что белки в водных растворах могут агрегировать, причём на этот процесс могут оказывать влияние различные физико-химические факторы.

Водные БДС частиц белка альбумина хорошо рассеивают свет видимого диапазона. Поэтому для их исследования можно использовать методы, основанные на светорассеянии (в частности, упругом).

В таблице 1 представлены результаты измерения параметров первого и расчётов параметров второго класса для модельных водных дисперсий белка альбумина различной концентрации, различной степени очистки от примесей.

Таблица 1. Оптические параметры первого и второго классов модельных водных дисперсий белка альбумина.

P <sub>i</sub>	Параметры или их комбинации	Отношение параметров второго класса											
		Д1	Д2	Д3	Д4	Д5	Д6	P <sub>ид1</sub> /P <sub>ид1</sub>	P <sub>ид2</sub> /P <sub>ид1</sub>	P <sub>ид3</sub> /P <sub>ид1</sub>	P <sub>ид4</sub> /P <sub>ид1</sub>	P <sub>ид5</sub> /P <sub>ид1</sub>	P <sub>ид6</sub> /P <sub>ид1</sub>
P <sub>1</sub>	D(400)	0,018	0,025	0,043	0,27	0,50	0,69						
P <sub>2</sub>	D(500)	0,009	0,012	0,020	0,16	0,30	0,43						
P <sub>3</sub>	D(600)	0,005	0,007	0,012	0,10	0,2	0,29						
P <sub>4</sub>	P <sub>1</sub> -P <sub>3</sub>	0,013	0,018	0,031	0,17	0,30	0,40						
P <sub>7</sub>	n(500)	3,18	3,15	3,15	2,34	2,21	2,16	1,00	0,99	0,99	0,74	0,69	0,68
P <sub>8</sub>	[n(500)] <sup>-1</sup>	0,31	0,32	0,32	0,42	0,45	0,46						
P <sub>9</sub>	I(60), у.е.	0,072	0,075	0,085	0,78	5,50	7,07						
P <sub>10</sub>	I(90), у.е.	0,061	0,062	0,072	0,49	2,90	2,65						
P <sub>11</sub>	I(120), у.е.	0,060	0,060	0,066	0,47	2,60	2,54						
P <sub>12</sub>	P <sub>9</sub> -P <sub>11</sub> , у.е.	0,012	0,015	0,019	0,31	2,9	4,53						
P <sub>13</sub>	P <sub>9</sub> /P <sub>10</sub>	1,18	1,21	1,18	1,59	1,90	2,66	1,00	1,03	1,00	1,34	1,61	2,25
P <sub>14</sub>	P <sub>2</sub> /P <sub>10</sub> , [у.е.] <sup>-1</sup>	0,25	0,15	0,1	0,33	0,12	0,16						
P <sub>15</sub>	P <sub>12</sub> /P <sub>4</sub> , у.е.	0,39	0,83	1,46	1,82	9,7	11,33						
P <sub>16</sub>	P <sub>8</sub> ×P <sub>13</sub>	0,37	0,39	0,38	0,67	0,86	1,22	1,00	1,05	1,03	1,81	2,32	3,30
P <sub>17</sub>	P <sub>14</sub> ×P <sub>15</sub>	0,10	0,12	0,15	0,60	1,16	1,81	1,00	1,20	1,50	6,00	11,6	18,10

Примечания.

1. Дисперсные системы: БСА производства фирмы Fluka (Д1—Д3), БСА производства фирмы Реахим (Д4—Д6); растворитель: дистиллированная вода; концентрации: 1мг/мл (Д1, Д4), 2мг/мл (Д2, Д5), 3мг/мл (Д3, Д6). Д1— реперная дисперсия.
2. D — оптическая плотность, в скобках указаны длины волн регистрации (нм);
3. n(500) — волновой экспонент для спектрального интервала со средней длиной волны 500 нм;
4. I — интенсивность рассеянного света, в скобках указаны углы регистрации (град).
5. Параметры второго класса выделены серым тоном.

На рис.6 представлены результаты, демонстрирующие невозможность использования параметров первого класса для определения состояния водных дисперсий БСА из-за чувствительности их к концентрации, независимость параметров второго класса от концентрации (они остаются практически неизменными, если состояние системы не меняется — рис.6а).

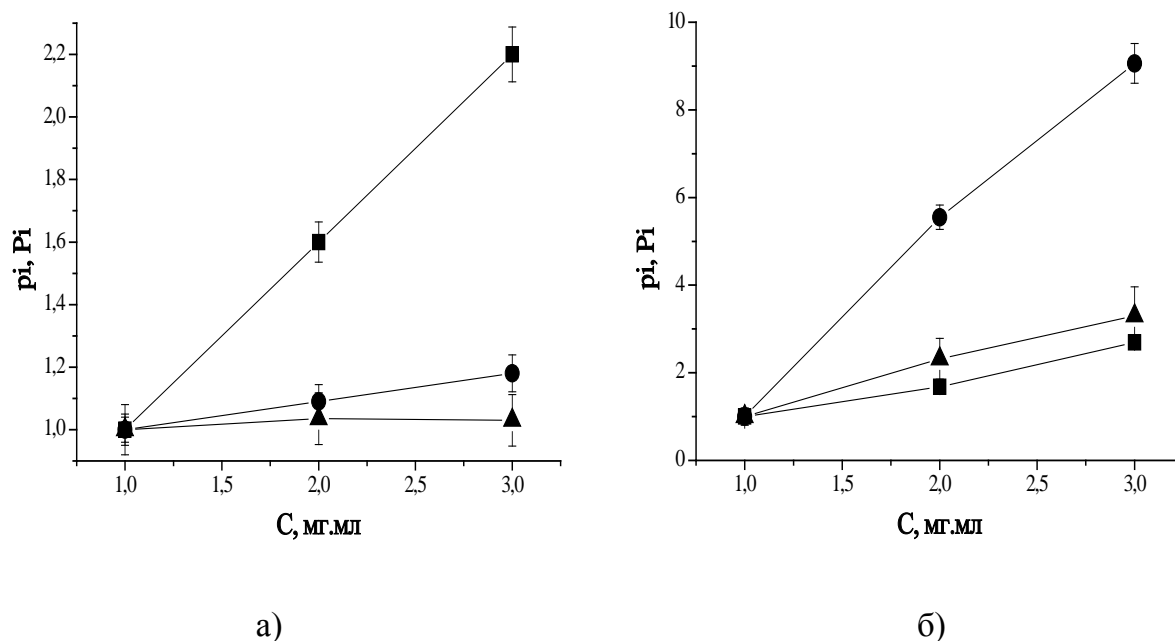


Рисунок 6. Сравнительный анализ информативности параметров первого  $p_i$  и второго класса  $P_i$  для определения состояния водных дисперсий БСА: а) производства фирмы Fluka (состояние практически не меняется при увеличении концентрации), б) производства «Реахим» (состояние изменяется). За «реперную» дисперсию в каждом случае принята соответствующая дисперсия с концентрацией белка  $1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Параметры  $p_i$ : ■ — оптическая плотность при  $\lambda = 500 \text{ нм}$  ( $D(500)$ ), ● — интенсивность светорассеяния для угла  $60^\circ$  ( $I(60)$ ). Параметр  $P_i$ : ▲ — комбинированный параметр  $P_{16}$  из табл.1.

БСА производства фирмы Fluka относится к белкам с достаточно высокой степенью очистки от примесей, поэтому его водные дисперсии устойчивы к агрегации. В данной серии опытов в качестве реперной дисперсии, содержащей наименьшее число агрегатов, была выбрана БДС БСА Fluka с концентрацией  $1 \text{ мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ . Результаты определения состояния различных водных дисперсий альбумина представлены на рис. 7.

Данные табл. 1 и рис.7 свидетельствуют о том, что молекулы БСА фирмы Реахим агрегируют при повышении концентрации частиц дисперсной фазы, изменении состава и pH дисперсионной среды. При отклонении величины pH от нейтральной (как в кислую, так и в щелочную область) эффективный диаметр частиц дисперсной фазы увеличивается (наибольший для  $\text{pH}=9,18$ ). Это может быть связано как с изменениями конформации («разворачиванием») белка, так и с происходящей агрегацией частиц. В водной БДС ЯА агрегация частиц идёт наиболее активно.

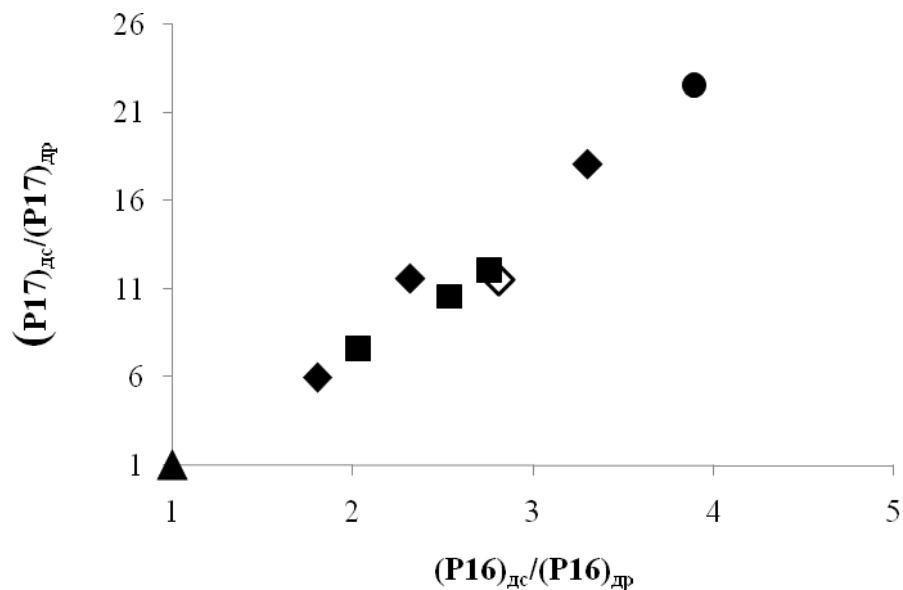


Рисунок 7. Сравнительный анализ состояния модельных водных дисперсий альбумина:

- ▲ — водная дисперсия БСА Fluka 1 мг·мл<sup>-1</sup> («реперная» дисперсия — рд);
- дисперсии сравнения (дс):
- ◆ — водные дисперсии БСА Реахим различной концентрации (1 мг·мл<sup>-1</sup>, 2 мг·мл<sup>-1</sup>, 3 мг·мл<sup>-1</sup> — рост концентрации соответствует увеличению параметров P<sub>16</sub> и P<sub>17</sub>), незатушёванный символ ◇ - 1 мг·мл<sup>-1</sup> (3 мг·мл<sup>-1</sup> разбавленная 1:2);
- — дисперсии БСА в 0,3 М ацетате аммония, значения РН=6,9; 3,56; 9,18 (величина P<sub>16</sub> и P<sub>17</sub> растёт соответственно);
- — водная дисперсия ЯА с концентрацией 1 мг·мл<sup>-1</sup>.

Используя подходы информационно-статистической теории, можно сопоставить абсолютные значения количественного параметра

$$P_{16} = \left[ \frac{I(60)}{I(90)_{дс}} / \frac{I(60)}{I(90)_{др}} \right] / \left[ \frac{n(500)_{дс}}{n(500)_{др}} \right], \quad (3)$$

(где дс, др — дисперсия сравнения и реперная дисперсия соответственно), величина которого, как было показано на модельных системах, зависит от эффективного диаметра частиц, с качественным (малый, средний, большой «размер частиц» (табл.2, табл.3)).

Таблица 2. Сопоставление количественного параметра второго класса P<sub>16</sub> с «размером частиц».

Качественный параметр (V <sub>i</sub> ) — «размер частиц»	Описание качественного параметра	Интервалы количественного параметра (P <sub>16</sub> ) для V <sub>i</sub> -го качественного параметра
V <sub>1</sub>	Самый малый	0 — 0,25
V <sub>2</sub>	Малый	0,25 — 0,5

V <sub>3</sub>	Малый средний	0,50 — 0,75
V <sub>4</sub>	Средний	0,75—1,00
V <sub>5</sub>	Малый большой	1,00—1,25
V <sub>6</sub>	Большой	1,25—1,50

Таблица 3. Классификация исследованных модельных дисперсий по «размерам частиц».

Дисперсия	Качественное состояние («размер частиц»)
водная дисперсия БСА Fluke 1мг/мл	V <sub>2</sub> (малый)
водная дисперсия БСА Реахим 1мг/мл	V <sub>3</sub> (малый средний)
водная дисперсия БСА Реахим 2мг/мл	V <sub>4</sub> (средний)
водная дисперсия БСА Реахим 3мг/мл	V <sub>5</sub> (малый большой)
водная дисперсия БСА 1мг/мл (3мг/мл разбавленная 1:2)	V <sub>4</sub> (средний)
дисперсия БСА Реахим в 0,3 М ацетате аммония, РН=6,9	V <sub>3</sub> (малый средний)
дисперсия БСА Реахим в 0,3 М ацетате аммония, РН= 3,56	V <sub>4</sub> (средний)
дисперсия БСА Реахим в 0,3 М ацетате аммония, РН=9,18	V <sub>5</sub> (малый большой)
водная дисперсия ЯА с концентрацией 1мг/мл.	V <sub>6</sub> (большой)

Приведя в соответствие дискретные качественные состояния с заданными по полученным экспериментально кусочно-непрерывными шкалами количественных состояний P<sub>16</sub>, можно отнести анализируемые водные белковые дисперсии к определённому классу (подклассу) по условному «размеру частиц». Увеличение P<sub>16</sub> свидетельствует об агрегации частиц.

**В Главе 5 «Сравнительная характеристика кинетики и условий взаимодействия частиц в модельных и природных БДС, содержащих сывороточный альбумин и синтетические полимеры»** рассматривается возможность применения разработанного алгоритма к исследованию более сложных систем, а именно: водных биологических дисперсий, содержащих биополимеры (белки) и синтетические полимеры — флокулянты. В этой части работы приведены результаты систематического исследования влияния различных характеристик полимеров, показателей дисперсионной среды на кинетику и условия взаимодействия частиц дисперсной фазы (эффективность флокуляции). Установлен преимущественный вклад электростатических (ион–ионных) и гидрофобных взаимодействий БСА с водорастворимыми полимерами. Показано, что соотношение вкладов каждого типа взаимодействия можно регулировать при

изменении физико-химических условий в дисперсной системе для различающихся по химическому строению, структуре и массе полимеров (табл.4).

Таблица 4. Физико-химические характеристики некоторых использованных в работе полимеров

№ образца	Состав полимера	Молекулярная масса, млн. Да (ММ $10^{-6}$ )	Содержание основного вещества, %
1	гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония (СМС, линейный, кат. заряд 3,5 мг-экв/г)	25,5	86
2	гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония (СМС, линейный, кат. заряд 3,5 мг-экв/г)	3,1	100
3	гомополимер метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоилоксиэтиламмония (СМС, разветвленный, кат. заряд 3,5 мг-экв/г)	14,0	100

Все вышеперечисленные результаты были получены при использовании в качестве информативного параметра, характеризующего взаимодействие частиц в дисперсии и кинетику процесса, следующего эмпирически подобранного комбинированного параметра второго класса:

$$P_t = \{ [I(60)/I(90)]_t / [I(60)/I(90)]_0 \} / \{ [D(400)/D(600)]_t / [D(400)/D(600)]_0 \}, \quad (4)$$

где индексы 0 и t обозначают значения параметров в нулевой момент и момент времени t. Для дифференцирования параметров использовали динамический метод (рис.8).

Вместе с тем, попытка проанализировать тот же процесс, используя стандартный для исследования агрегации частиц в коллоидных растворах параметр

$$P_{st} = \frac{D(500)_t - D(500)_0}{D(500)_t}, \quad (\text{рис.9}), \text{ показала его меньшую информативность.}$$

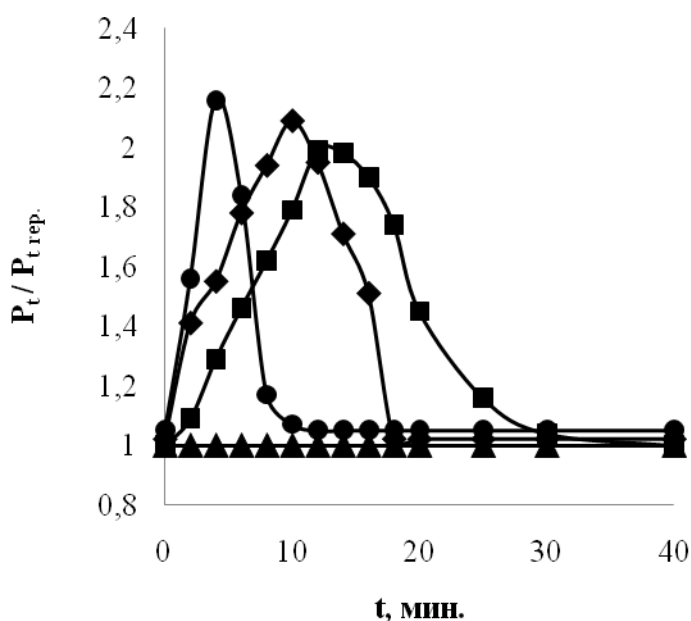


Рисунок 8. Кинетические зависимости взаимодействия частиц в ходе процесса флокуляции в дисперсиях, содержащих, как БСА «Рехим» ( $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ), так и синтетические полимеры ( $5 \text{ мг} \cdot \text{л}^{-1}$ ) при  $\text{pH}=9,18$ : ▲ — «реперная» дисперсия БСА «Рехим» ( $1 \text{ мг} \cdot \text{мл}^{-1}$ ), ■ — дисперсия, содержащая линейный полимер с ММ 3,1 МДа, ◆ — дисперсия, содержащая линейный полимер с ММ 25,5 МДа, ● — дисперсия, содержащая разветвленный полимер с ММ 14,0 МДа.  $P_t$  — эмпирически подобранный в работе параметр.

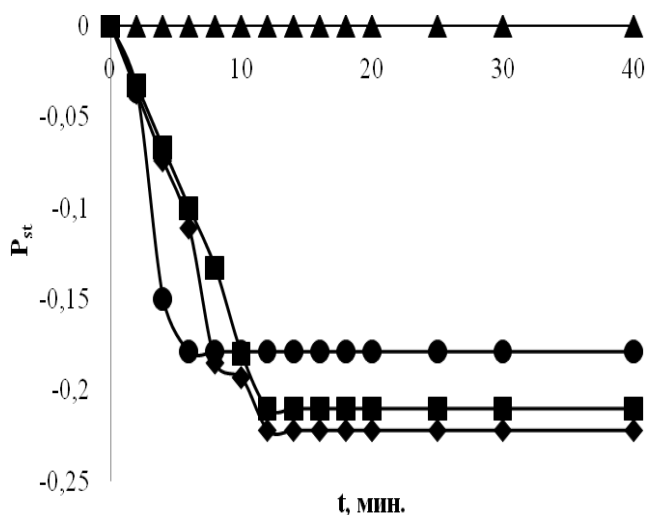


Рисунок 9. Кинетические зависимости взаимодействия частиц в ходе процесса флокуляции в дисперсиях, содержащих, как БСА «Реахим» ( $1\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ), так и синтетические полимеры ( $5\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) при  $\text{pH}=9,18$ : ▲ — «реперная» дисперсия БСА «Реахим» ( $1\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ), ■ — дисперсия, содержащая линейный полимер с ММ 3,1 МДа, ◆ — дисперсия, содержащая линейный полимер с ММ 25,5 МДа, ● — дисперсия, содержащая разветвлённый полимер с ММ 14,0 МДа.  $P_{st}$  — стандартный параметр.

Экспериментально-параметрический подход позволил сравнить условия взаимодействия частиц и кинетику процессов флокуляции в различных по составу и структурной сложности системах (рис. 10).

Из рис.10 видно, что процесс взаимодействия частиц идёт наиболее активно в модельной однокомпонентной БДС БСА Fluka, а в поликомпонентной системе (плазма крови) происходит сложный процесс взаимодействия (возможно, конкурентный).

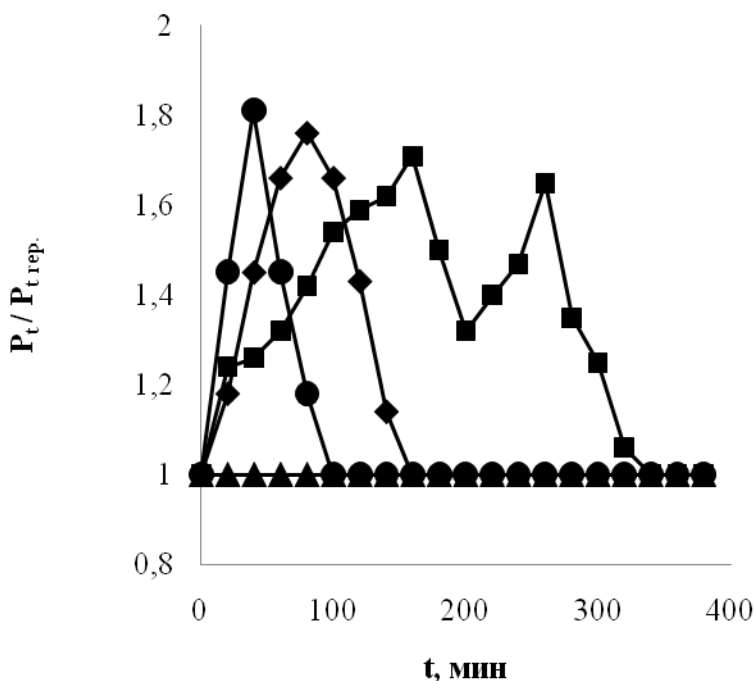


Рисунок 10. Кинетические зависимости взаимодействия частиц в ходе процесса флокуляции в дисперсиях, содержащих, как белок, так и линейный синтетический полимер ( $5\text{мг}\cdot\text{л}^{-1}$ ) при близких к нейтральным значениям  $\text{pH}$ : ▲ — «реперная» дисперсия (для каждого образца своя), ■ — плазма крови белых беспородных крыс и полимер с ММ 3,1 МДа, ◆ — дисперсия частиц БСА «Реахим» ( $1\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ) и полимер с ММ 25,5 МДа, ● — дисперсия частиц БСА «Fluka» ( $1\text{мг}\cdot\text{мл}^{-1}$ ) и полимер с ММ 25,5 МДа.

Результаты, полученные в ходе предварительных исследований кинетики и условий взаимодействия частиц в БДС, содержащих белок и синтетические полимеры, были использованы на практике. Обработка культуральной жидкости антибиотика полиэлектролитами, в подобранном оптимальном интервале концентраций, привела к выделению осадка примесных компонентов белковой природы. При этом активность антибиотика до обработки и после нее практически не менялась. Разветвленный образец СМС с молекулярной массой 14,0 МДа обладал лучшими равновесными и кинетическими свойствами по сравнению с линейными поликатионами, что полностью соответствовало результатам экспериментов на модельных системах.

В Главе 6 «Сравнительная характеристика процессов связывания радахлорина с компонентами модельных и природных дисперсий» анализируемые водные БДС не только рассеивали, но и поглощали свет видимого диапазона, поскольку были окрашены используемым в медицинской практике для фотодинамической терапии фотосенсибилизатором (ФС) радахлорином (РХ). В диссертации приведены результаты систематического исследования как оптических свойств водных дисперсий РХ (например, рис.11), так и окрашенных им модельных и природных БДС (например, рис.12).

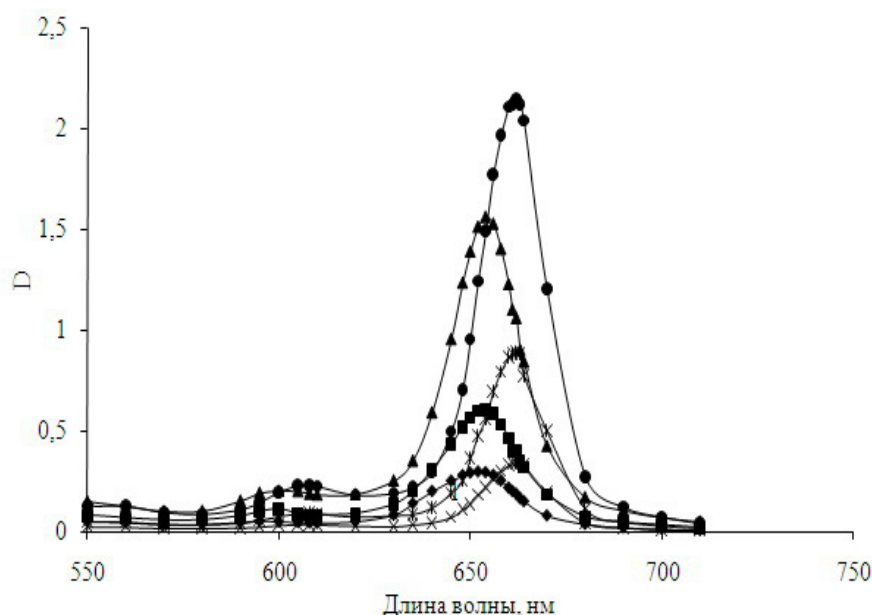


Рисунок 11. Спектры оптической плотности водных и спиртовых растворов радахлорина с концентрацией: 0,0088% ( $\blacktriangle$  – в воде,  $\bullet$  – в спирте); 0,0044% ( $\blacksquare$  – в воде,  $*$  – в спирте), 0,0022% ( $\blacklozenge$  – в воде,  $\times$  – в спирте).

В работе были определены длины волн, соответствующие максимумам поглощения (410, 508 и 650 нм) и флуоресценции водных растворов РХ (один из максимумов 650 нм при возбуждении светом с длиной волны 407 нм). Был



определён рабочий диапазон длин волн (600 нм — 700 нм) , в котором ФС активно поглощал, но не наблюдалось поглощения у биологических объектов, которые предполагалось окрашивать РХ.

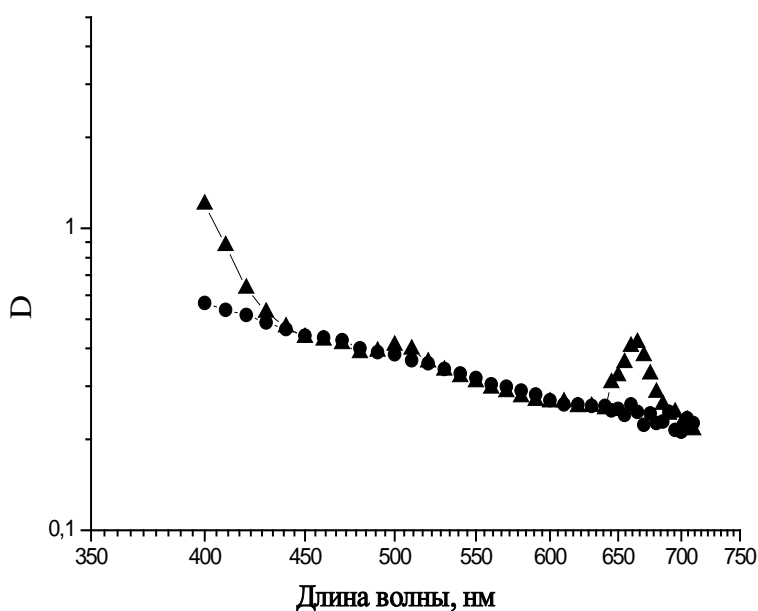


Рисунок 12. Спектры оптической плотности (билогарифмическое представление): ● — водный раствор БСА 1 мг·мл<sup>-1</sup>; ▲ — водный раствор БСА 1 мг·мл<sup>-1</sup>, окрашенный радахлорином (0,0023%).

Проведённые исследования показали, что у РХ различаются длины волн максимумов поглощения в воде и 96% этиловом спирте (650 и 662 нм соответственно). Причём 662 нм соответствует максимуму поглощения мономеров РХ (активные производители синглетного кислорода в фотодинамической терапии), а связывание РХ с компонентами биообъектов при введении его, как *in vitro* так и *in vivo* происходит в основном в мономерном состоянии.

В качестве информативных параметров второго класса, характеризующих процесс связывания красителя с компонентами БДС, эмпирически подобраны параметры, чувствительные к различиям в поглощении света мономерами и ассоциатами радахлорина, а именно:  $P_9 = D(650)/D(660)$  и  $P_{11} = [D(650) - D(670)]/D(660)$  (номера параметров соответствуют номерам из таблиц, представленных в диссертации). Для дисперсий РХ в спирте (мономеры) и воде (в основном ассоциаты) величина параметра  $P_{11}$  различается даже по знаку. Дифференцирование состояний различных биодисперсий проведено с помощью статического метода. В качестве «реперной» (наибольшее содержание мономеров) выбрана дисперсия 0,0022% РХ в 96% спирте (рис.13).

На рис.13 представлены результаты проведённых в работе исследований.

Из анализа данных рис.13 следует, что больше всего мономеров РХ содержится в плазме крови здорового животного. Для других дисперсий возможна следующая последовательность по активности связывания РХ с компонентами

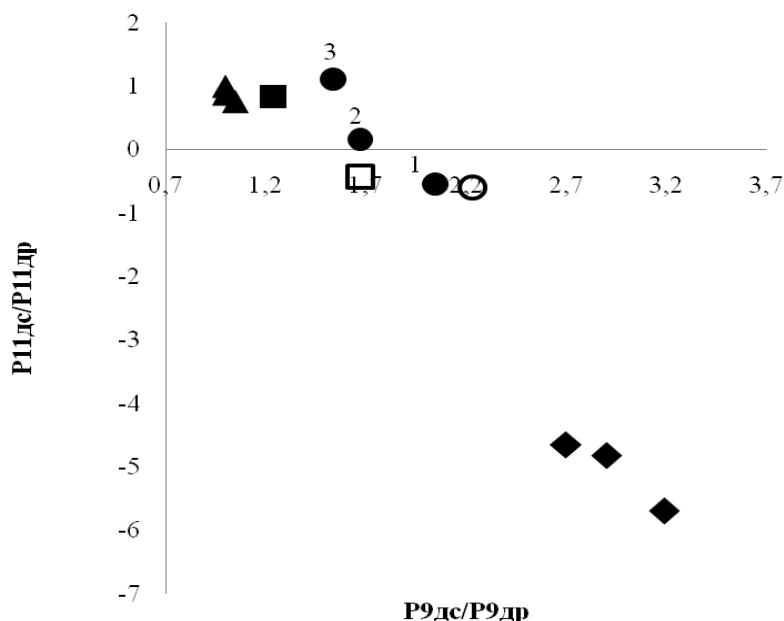


Рисунок 13. Сравнительный анализ состояния РХ (мономеры, ассоциаты) в БДС: ▲ — реперная водная дисперсия РХ ( обозначена — др), дисперсии сравнения (дс):

◆ — дисперсии РХ различной концентрации в дистиллированной воде (ассоциаты и мономеры в различных сочетаниях — ассоциаты доминируют), ● — дисперсии, содержащие РХ 0,0088% и частицы БСА (1 — с концентрацией 1 мг·мл<sup>-1</sup>, 2 — с концентрацией 2 мг·мл<sup>-1</sup>, 3 — с концентрацией 1 мг·мл<sup>-1</sup>, дисперсия белка предварительно облучена лазером ( $\lambda=650$  нм, P = 3 мВт,  $t_{обл.} = 8$  мин.), ■ — плазма крови здоровой крысы (забор через 1,5 часа после введения 0,0088% РХ), □ — плазма крови крысы с привитой лимфосаркомой (забор через 1,5 часа после введения 0,0093% РХ in vivo);○ — водная дисперсия гомогената опухолевой ткани крысы с привитой лимфосаркомой через 1 час 30 минут после введения РХ in vivo с концентрацией 0,0050% .

биообъектов: облучённая ( $\lambda=650$  нм, P = 3 мВт,  $t_{обл.} = 8$  мин.) модельная водная дисперсия БСА (1мг·мл<sup>-1</sup>) > БДС БСА (2мг·мл<sup>-1</sup>) > плазма крови крысы с привитой лимфосаркомой (забор через 1,5 часа после введения 0,0093% РХ in vivo) > модельная БДС БСА (1мг·мл<sup>-1</sup>) > водная дисперсия гомогената опухолевой ткани крысы с привитой лимфосаркомой через 1 час 30 минут после введения РХ in vivo с концентрацией 0,0050%.

На рис. 14 представлены результаты проведенного анализа содержания мономерных форм красителя в модельных водных дисперсиях БСА с различной концентрацией белка и фиксированной концентрацией ФС.

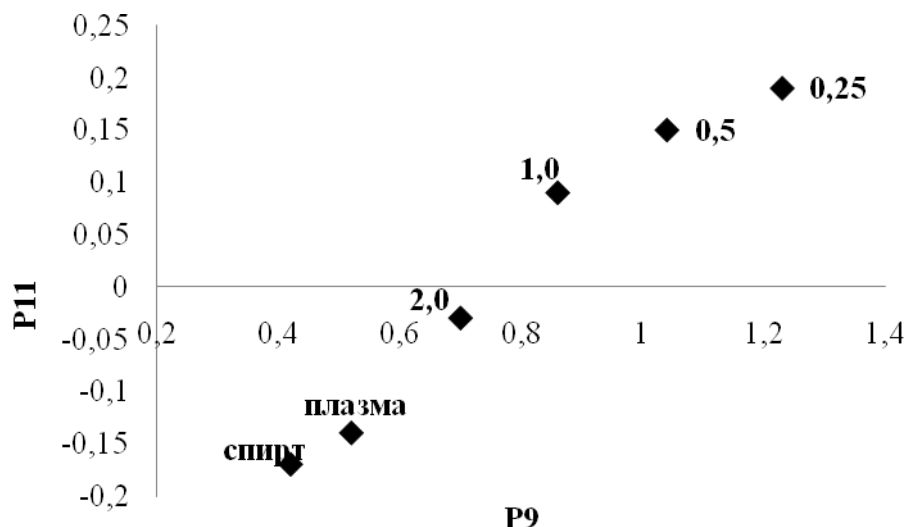


Рисунок 14. Сравнительная характеристика содержания мономеров РХ в БДС БСА (подписанные над точками цифры соответствуют концентрации белка в мг·мл<sup>-1</sup>) с концентрацией красителя 0,0088%.

Из рис.14 видно, что количество мономерных форм красителя возрастает с увеличением концентрации белка, т.е. увеличивается его связывание с белком (максимально для данной концентрации РХ— в плазме). Эти результаты могут найти практическое применение для разработки методик определения концентрации активных (мономерных) форм фотосенсибилизатора в БДС.

**Глава 7 «Сравнительный анализ состояния БДС клеток кишечной палочки (on-line выявление штаммовых различий)»** посвящена исследованию водных БДС микрочастиц— клеток кишечной палочки. Ряд практических медицинских и биотехнологических задач связан с определением активности метаболического состояния клеток (сравнение с отмиранием— апоптозом), с выявлением штаммовых различий (например, патогенный и непатогенный) и др. Для решения подобных задач достаточно информативными являются исследования элементов матрицы рассеяния света (поскольку изменяется морфология клеток). Однако их непосредственная интерпретация при сравнении различных клеток бывает затруднительной, поскольку отсутствует тонкая структура индикатрисы и других элементов матрицы, если системы полидисперсны, а при наличии тонкой структуры сложно сопоставить между собой множество максимумов и минимумов, характеризующих каждый тип клеток.

В работе с помощью метода спектротурбидиметрии было показано, что клетки кишечной палочки двух штаммов АВ 1157 и К-802 различаются по размерам (клетки штамма К-802 меньше в 3раза).

Используя данные дифференциального (нефелометрия) рассеяния с учётом поляризации падающего и рассеянного излучения, выбрав в качестве «реперной» БДС штамм *E.coli* K-802 (с наименьшим размером клеток), были выявлены различия параметров второго класса у анализируемых штаммов (табл.5).

Таблица 5. Оптические параметры второго класса для БДС клеток кишечной палочки разных штаммов.

P <sub>i</sub>	Параметры или их комбинации	Значение параметра для штамма		Отношение параметров второго класса	
		K-802	AB1157	P <sub>iK-802</sub> / P <sub>iK-802</sub>	P <sub>iAB1157</sub> / P <sub>iK-802</sub>
P <sub>1</sub>	I <sub>h</sub> (60)/ I <sub>h</sub> (90)	10	20	1	2
P <sub>2</sub>	I <sub>v</sub> (60)/ I <sub>v</sub> (90)	3	8	1	2,7
P <sub>3</sub>	I <sub>v</sub> (60)/ I <sub>v</sub> (120)	3	11	1	3,7
P <sub>4</sub>	I <sub>v</sub> (90)/ I <sub>h</sub> (90)	10	3	1	0,3
P <sub>5</sub>	P <sub>1</sub> × P <sub>2</sub>	30	160	1	5,3
P <sub>6</sub>	P <sub>3</sub> /P <sub>4</sub>	0,3	3,7	1	12,3

Примечания.

1. I<sub>h</sub>(Θ), I<sub>v</sub>(Θ) — интенсивности рассеяния соответственно горизонтально и вертикально (относительно плоскости регистрации) поляризованного падающего излучения
2. Для параметров от P<sub>1</sub> до P<sub>5</sub> приведены средние округлённые до целого значения.

В качестве параметра второго класса можно рассматривать любой элемент матрицы рассеяния, нормированный на первый элемент – индикатрису. Это позволяет обработать результаты измерения угловых зависимостей элементов матрицы рассеяния, которые трудно непосредственно сравнить и интерпретировать (Табл.6).

Таблица 6. Оптические параметры второго класса для БДС клеток кишечной палочки разных штаммов (по данным работы Bronk B.V., Van de Merwe W.P., Stanley M. In vivo Measure of Average Bacterial Cell Size from a Polarized Light Scattering Function//Cytometry. 1992. V.13. P.155-162).

P <sub>i</sub>	Параметры или их комбинации	Значение параметра для штамма		Отношение параметров второго класса	
		B/г	K-12	P <sub>iB/r</sub> / P <sub>iB/r</sub>	P <sub>iK-12</sub> / P <sub>iB/r</sub>
P <sub>1</sub>	f <sub>34</sub> (40)	-4	-42	1	10,5
P <sub>2</sub>	f <sub>34</sub> (60)	-3	20	1	-6,7
P <sub>3</sub>	f <sub>34</sub> (70)	-2	-56	1	28
P <sub>4</sub>	f <sub>34</sub> (130)	3	24	1	8
P <sub>5</sub>	P <sub>2</sub> × P <sub>4</sub>	-9	480	1	-53,4
P <sub>6</sub>	P <sub>1</sub> × P <sub>3</sub>	8	2352	1	294

Примечание: f<sub>34</sub>(Θ) — приведённый элемент матрицы рассеяния, Θ — угол рассеяния. За «реперную» выбрана БДС клеток *E.coli* B/г.

Набор параметров второго класса отражает в неявном виде особенности состояний дисперсий различных клеток, позволяет сравнить их с «реперным», а также определить изменения состояний.

Таким образом, в диссертации показан широкий спектр возможностей применения разработанного алгоритма для исследования дисперсий, отличающихся по составу и свойствам.

### **Основные результаты и выводы диссертации**

1. На базе информационно-статистической теории и многопараметрического оптического анализа созданы экспериментально-параметрические методы определения состояния водных биологических дисперсных систем «без регуляризации», в том числе статический и динамический дифференциальные методы;
2. Разработан алгоритм экспериментально-параметрического определения состояний водных биологических дисперсий для их сравнительного анализа в режиме реального времени;
3. Для серии биодисперсий на основе использования результатов анализа поглощения и рассеяния (интегрального и дифференциального, в том числе с учётом поляризации) показана принципиальная возможность применения разработанного алгоритма, определены информативные параметры второго класса;
4. Впервые получены научные результаты, имеющие прикладное медико-биологическое значение:
  - Показана принципиальная возможность использования новых синтетических полимеров на основе гомополимера метилсульфатной соли N, N, N, N-триметилметакрилоксиэтиламмония различной молекулярной массы и структурной организации в качестве флокулянтов в модельных и используемых на практике системах;
  - Определены кинетика и условия взаимодействия частиц БСА с синтетическими полимерами при вариации концентрации, молекулярной массы, структурной организации, химического состава, содержания и типа ионогенных групп растворимых полимеров, а также pH среды;
  - На базе проведённых на модельных системах исследований, определены оптимальные условия флокуляции примесных белков в культуральной жидкости противоопухолевого антрациклинового антибиотика рубомицина.
  - Определено, что в водном растворе фотосенсибилизатора радахлорина присутствуют в основном его ассоциаты (поглощение при  $\lambda_{\max} = 650$

нм), а в спиртовом— мономеры ( $\lambda_{\max} = 662$  нм). Установлено, что в плазме крови (при используемых в терапии концентрациях) РХ присутствует в основном в виде мономеров ( $\lambda_{\max} = 660-663$  нм), способных активно производить синглетный кислород;

- Определено, что лимфосаркома насыщается ФС на порядок активнее здоровой мышечной ткани, причём в спектрах оптической плотности присутствуют максимумы поглощения, характерные как для свободных ассоциатов (650 нм), так и для связанных мономеров РХ (660 нм);
- Результаты исследований с использованием РХ могут найти практическое применение при разработке методик определения концентрации его активных (мономерных) форм.
- Определены оптические параметры второго класса для водных дисперсий клеток кишечной палочки различных штаммов, отражающие в неявном виде особенности состояний биодисперсий и позволяющие сравнить их с «реперным» состоянием, а также определить изменения состояний.

### **Основные публикации по теме диссертации**

1. Оптический анализ минеральных взвесей природных водоёмов с использованием фильтрации/Власова О.Л., Безрукова А.Г., Мchedlishvili Б.В., Коликов В.М., Нерода Л.М., Никифорова Т.В.// Оптика моря и атмосферы Тез.докл. 1988 Л. С.124.
2. **Применение спектротурбидиметрии для анализа минеральных взвесей природных водоёмов/ Власова О.Л., Безрукова А.Г., Мchedlishvili Б.В., Коликов В.М., Нерода Л.М., Никифорова Т.В.// Химия и технология воды. 1989. № 3. С. 237—239.**
3. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Коликов В.М. Исследование проб воды финского залива оптическими методами// Оптика моря и атмосферы: Тез.докл. 1990. Красноярск. С.82.
4. Vlasova O.L., Bezrukova A.G., Kolikov V.M. Stability of mineral and organic disperse systems at storage//XI European Conference Chemistry of Interfaces. 1990. Berlin. P.140.
5. **Черкасов А.Н., Власова О.Л., Царева С.В., Коликов В.М., Мchedlishvili Б.В. Ультрафильтрация на ядерных фильтрах// Коллоидный журнал. 1990. Т. 52. № 2. С. 323—328.**
6. **Власова О.Л., Безрукова А.Г., Мchedlishvili Б.В., Коликов В.М. Анализ распределения частиц каолиновой дисперсии по размерам//Коллоидный журнал. 1991. Т.53. № 5. С.826—829.**
7. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Коликов В.М. Экспресс-анализ состояния суспензии клеток кишечной палочки//В сб.: Передовой производственный опыт в медицинской промышленности, рекомендованный для внедрения. 1991. № 2. С.32—38.

8. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Коликов В.М., Симонова Г.М., Бетькенов В.А. **Способ анализа дисперсных систем по размерам**//А.с. №1718043. 1992.
9. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Коликов В.М. Получение распределения частиц по размерам в клеточных дисперсиях с помощью спектротурбидиметрии//В сб. тезисов IV Пущинского совещания «Культивирование клеток животных и человека. Проблемы цитотехнологии». 1994. Пущино. С.16.
10. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Коликов В.М. Пути решения обратной задачи светорассеяния на примере смешанной дисперсии биологических и минеральных частиц//Фундаментальные исследования в технических университетах. Материалы научно-технической конференции. 1998. СПб. С.172.
11. Власова О.Л., Молодкина Л.М., Вовк М.П. **Разработка перспективных методик использования плазмодифильных мембран на основе трековых мембран**//Научно-технические ведомости СПбГТУ. 1998. №2-3. С. 128–132.
12. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Коликов В.М. **Оптический анализ смешанной биоминеральной дисперсной системы (Модели воды маркизовой лужи)**//Научно-технические ведомости СПбГТУ. 1998. № 2-3. С.152–157.
13. Безрукова А.Г., Власова О.Л., Молодкина Л.М. Фундаментальные исследования природных вод как элемент программы экологической безопасности//Материалы III Всероссийской научно-технической конференции «Фундаментальные исследования в технических университетах».— СПб: Изд-во СПбГПУ, 1999. С. 150 – 151.
14. Власова О.Л., Тимофеев А.Н., Молодкина Л.М., Безрукова А.Г. Комплексный анализ параметров состояния биомедицинских дисперсных систем//Труды Международной научно-практической конференции «Измерительные и информационные технологии в охране здоровья (МЕТРОМЕД-99).— СПб: Изд-во СПбГПУ, 1999. С. 21–22.
15. Безрукова А.Г., Власова О.Л., Молодкина Л.М., Коликов В.М. Многопараметрический анализ смешанных биоминеральных дисперсных систем (Модели природных вод)// Тез.докл. II съезда биофизиков России. 1999. М. II т. VII.3. С.585.
16. Bezrukova A.G., Kotel'nikov S.K., Vladimirskaia I.C., Vlasova O.L. Side elastic light scattering of biological particles// Abstract 4-th Conference on Electromagnetic and Light scattering by Nonspherical Particles. Theory and Applications. 1999. Vigo (SPAIN). A1.7.
17. Власова О.Л., Безрукова А.Г. Применение информационных технологий для оптического контроля биомедицинских и природных дисперсных систем // Труды Международной конференции «Информационные и бизнес-технологии XXI века (ИВТ-XXI)». СПб. 1999. С.45–47.
18. Безрукова А.Г., Власова О.Л., Молодкина Л.М., Тимофеев А.Н. Концепция междисциплинарных фундаментальных исследований биомедицинских и природных дисперсных систем в Санкт-Петербургском государственном техническом университете//Материалы международной конференции «Интернационализация высшего образования и научных исследований в 21 веке: роль технических университетов». — СПб: Нестор, 1999. С.257-260.
19. Bezrukova A.G., Vlasova O.L., Karamyan N.A., Molodkina L.M. Heteroaggregation in mixtures of biological and mineral disperse systems//Abstracts of the 10th International Conference on Colloid and Interface Science. 2000. Bristol. United Kingdom. Biological applications. Вap-30.
20. Bezrukova A., Vlasova O., Molodkina L. Optical and electrokinetic properties of biological and mineral disperse systems and their mixtures//Abstracts of International Symposium on Electrokinetic Phenomena (ELKIN) and IUPAC Workshop. Dresden. 2000. P.40

21. Власова О.Л., Безрукова А.Г. Принципы создания лазерных датчиков контроля для медицины, биологии и экологии// Материалы научной конференции «Лазеры, измерения, информация». СПб. 2001. С. 69.
22. Власова О.Л., Безрукова А.Г. Новые наукоемкие фотометрические технологии в медицине, биологии и экологии/ Материалы научно-практической конференции «Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий». — СПб: Изд-во СПбГТУ, 2001. С. 29—34.
23. Власова О.Л. Лазерный контроль дисперсного состава жидких сред в биологии, медицине, экологии// Материалы научной конференции «Лазеры для медицины, биологии и экологии». СПб. 2002. С. 36.
24. Bezrukova Alexandra G., Vlasova Olga L. Mixes biological and mineral colloid particles as models of natural waters// Abstract for the XVI Conference of the European Colloid and Interface Society. Paris. Session 6: Biological Colloids. 2002. P. 6.
25. Bezrukova Alexandra G., Vlasova Olga L. Laser light scattering matrix elements for nanoparticle disperse systems//Abstract for Electrostatics (as part of The Physics Congress). 2003. Edinburgh. Abstract reference: 000076.
26. **Bezrukova Alexandra G., Vlasova Olga L. Laser light scattering matrix elements for nanoparticle disperse systems//The Proceedings of the Petersburg Academy of Sciences on Strength Problems. 2002. V.6. P.17 —19.**
27. **Vlasova Olga L. and Bezrukova Alexandra G. Laser control of natural nanoparticle disperse systems// Proceedings of SPIE ( Society of Photo-optical Instrumentation Engineering ). 2003. V. 5127. P. 154—158.**
28. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Принципы создания лазерных датчиков контроля для медицины, биологии, экологии//Труды международной научно-практической конференции «Измерительные информационные технологии и приборы в охране здоровья (Метромед-2003)». СПб. 2003. С.31—32.
29. Безрукова А.Г., Власова О.Л., Вахтина А.А., Наконечная А.О., Сударикова А.В., Тихонова Н.С. Сравнительное исследование структурных особенностей вирусов// Материалы VIII Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах». — СПб: Изд-во СПбГПУ, 2004. С. 276 — 277.
30. Безрукова А.Г., Власова О.Л., Тихонова Н.С. Сравнительное исследование структуры вирусов (биологических наночастиц) как основа диагностики их функциональных особенностей /Материалы научно-практической конференции и школы-семинара "Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий". — СПб: Изд-во СПбГПУ, 2004. С.382 —385.
31. Безрукова А.Г., Власова О.Л. Развитие оптических методов для исследования и контроля микро- и нано-частиц// Материалы научно-практической конференции и школы-семинара «Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий».— СПб: Изд-во СПбГПУ, 2004. С.386— 388.
32. **Власова О.Л., Безрукова А.Г. Физико-химические основы оптического анализа структуры и состава биосистем в медицине. — СПб.: Изд-во СПбГПУ, 2004. 81 с.**
33. Безрукова А.Г., Власова О.Л. Проблемы контроля биологических микро- и нано-частиц в среде оптическими методами/ Тезисы докладов III Съезда биофизики России. 2004. С. 57.
34. Разработка новой наукоемкой инновационной технологии фотодинамической диагностики рака/ Власова О.Л., Килимник В.А., Любинский А.И., Степанов А.В., Тертычная Л.В., Самойлов В.О. // Материалы научно-практической конференции и школы-семинара «Формирование технической политики инновационных наукоемких технологий». — СПб: Изд-во СПбГПУ, 2004. С.389—398.



35. Власова О.Л., Самойлов В.О. Современные наукоёмкие фотометрические технологии в медицине//Успехи современного естествознания. 2004. № 2. С.62.
36. Особенности применения «Радахлорина» для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии онкологических заболеваний/ Власова О.Л., Килимник В.А., Леонтьева Н.В., Любинский А.И., Самойлов В.О., Тертычная Л.В.// Тезисы докладов конференции «Лазеры для медицины, биологии и экологии». — СПб: Изд-во БГТУ, 2006. С. 6—7.
37. Безрукова А.Г., Власова О.Л. Системный подход к проблеме присутствия микро- и наночастиц в природных дисперсных системах. Новые методы оптического контроля биологических частиц// Материалы XIII Международной научно-методической конференции «Высокие интеллектуальные технологии и инновации в образовательно-научной деятельности». — СПб: Изд-во СПбГПУ, 2006. С.236.
38. Безрукова А.Г., Власова О.Л., Прокофьева Д.С. Системный подход к проблеме присутствия микро- и нано-частиц в природных дисперсных системах: 4. Оптический контроль минеральных частиц// Материалы X Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах». — СПб: Изд-во СПбГПУ, 2006. С. 375.
39. Власова О.Л., Сизова О.В., Любинский А.И. Спектрофотометрическое определение концентрации и оценка состояния радахлорина в мышце и плазме крови животного// Материалы X Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах».— СПб: Изд-во СПбГПУ, 2006. С.376.
40. Плотникова П.В., Власова О.Л., Грошикова А.Р., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Использование растворимых катионных полиэлектролитов для флокуляции нативных растворов противоопухолевых антибиотиков// Материалы X Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования в технических университетах». — СПб: Изд-во СПбГПУ, 2006. С.383.
41. Плотникова П.Л., Власова О.Л., Грошикова А.Р., Писарев О.А. Флокулирующие свойства полиэлектролитов на основе N,N,N, N триметилметакрилоилоксиэтиламмония// В сб. тезисов докладов «Современные проблемы науки о полимерах». СПб. 2006. С.103.
42. Власова О.Л., Плотникова П.В., Грошикова А.Р., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Использование растворимых флокулянтов для интенсификации биотехнологических процессов//Материалы Международной конференции «Медбиотек-3». М. 2006. С.22.
43. Vlasova O.L., Plotnikova P.V., Pisarev O.A., Panarin E.F. Creation of new ecologically safe technology of production antitumor antibiotic rubomycin//Abstracts celebrating the 25<sup>th</sup> DECHEMA annual convention of biotechnologists «European BioPerspectives». Köln. 2007. P. 137.
44. Сизова О.В., Власова О.Л. Оптические свойства растворов бычьего сывороточного альбумина и плазмы крови животных, фотосенсибилизированных радахлорином//В сб. Научные исследования и инновационная деятельность СПб: Изд-во СПбГПУ, 2007. С. 262— 269.
45. Власова О.Л., Плотникова П.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Исследование процессов комплексообразования биологически активных веществ и синтетических полимеров методами оптической спектроскопии// Научно-технические ведомости СПбГПУ. 2007. Т. 50. № 2. С.32—39.
46. Власова О.Л., Плотникова П.В., Писарев О.А., Панарин Е.Ф. Структурно-функциональные исследования процесса флокулообразования в модельных

- биосистемах// **Научно-технические ведомости СПбГПУ. 2007. Т. 51. № 3. С.176–180.**
47. Плотникова П.В., Власова О.Л. Многопараметрический оптический анализ конформационных переходов белковых примесей растворов БАВ в присутствии синтетических полиэлектролитов //Материалы научно-практической конференции «Научные исследования и инновационная деятельность». — СПб: Изд-во СПбГПУ, 2008. С. 159–165.
48. Плотникова П.В., Власова О.Л. Применение комплексной on-line методики контроля и управления качеством антрациклиновых антибиотиков в биотехнологическом производстве //Сборник трудов XIV международной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Современные техника и технологии». — Томск: Изд-во ТПУ, 2008. Т. 3. С. 270–272.
49. Власова О.Л., Безрукова А.Г., Плотникова П.В., Любинский А.И. Многопараметрический оптический анализ модельных и природных альбуминосодержащих систем //Материалы XII Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования и инновации в технических университетах». — СПб.: Изд-во СПбГПУ, 2008. С. 266–267.
50. Alexandra G. Bezrukova, Olga L. Vlasova. Cell Strains Differentiation by Innovative Optical Research Platform//Booklet of the 3rd International Workshop on Approaches to Single-Cell Analysis. Zurich. 2008. P.7.
51. Власова О.Л., Писарев О.А., Безрукова А.Г., Плотникова П.В. Оптический способ определения размеров частиц дисперсной системы/Патент РФ на изобретение № 2335760// Бюллетень изобретений. 2008. № 28.
52. Плотникова П.В., Власова О.Л., Писарев О.А., Панарин Е.Ф., Groshikova A.P. Влияние молекулярной массы и структурной организации катионных полиэлектролитов на флокуляцию белка// Журнал прикладной химии. 2008. т.81. №9, 1533–1536.
53. Власова О.Л., Любинский А.И., Сизова О.В. Экспериментальная оценка концентрации и состояния агрегации фотосенсибилизатора радахлорин в плазме крови и мышечной ткани крыс по данным спектрофотометрии// **Научно-технические ведомости СПбГПУ. 2008. Т.76. № 3. С.208–215.**
54. Плотникова П.В., Власова О.Л. Структурно-функциональное оптическое исследование рН-зависимых конформационных переходов в модельных растворах БСА, содержащих синтетические полиэлектролиты// **Научно-технические ведомости СПбГПУ. 2008. Т.76. № 3. С.223–230.**
55. Bezrukova Alexandra G., Vlasova Olga L. Innovative platform for nanoparticle interfaces optical sensing//Abstract for the Nanotech Northern Europe. Copenhagen. 2008. P.43.
56. Безрукова А.Г., Власова О.Л., Кубасов А.В. Комплексный подход к проблеме оптической диагностики клеток на стадии апоптоза// Материалы XIII Всероссийской конференции по проблемам науки и высшей школы «Фундаментальные исследования и инновации в технических университетах». — СПб.: Изд-во СПбГПУ, 2009. С.69.
57. Плотникова П.В., Власова О.Л. Структурно-функциональное исследование процесса образования поликомплексов сывороточного альбумина с катионными полиэлектролитами //Материалы Всероссийской межвузовской научной конференции студентов и аспирантов XXXVII Неделя науки СПбГПУ. — СПб.: Изд-во СПбГПУ, 2008. С. 20–22.
58. Плотникова П.В., Власова О.Л. Многопараметрический оптический анализ механизмов образования макромолекулярных поликомплексов //Материалы

- международной научно-практической конференции XXXVIII Неделя науки СПбГПУ.— СПб: Изд-во СПбГПУ, 2009. С. 51—53.
59. Власова О.Л., Любинский А.И. Экспериментальная оценка влияния излучения низкоэнергетического лазера на связывание радахлорина с компонентами биосистем и его функциональную активность// В сб.: Лазеры, Измерения. Информация: Материалы 19-й международной конференции – СПб: Изд-во СПбГПУ. 2009. С. 273—281.
60. Власова О.Л. Многопараметрический подход к оптическому анализу модельных дисперсий бычьего сывороточного альбумина// Научно-технические ведомости СПбГПУ. 2009. Т.77. № 2. С.39 — 45.
61. Bezrukova Alexandra G., Vlasova Olga L. Aggregation of protein nanoparticles testing by optical spectroscopy//Materials Physics and Mechanics. 2010. V.9. № 3. P.167 — 174.
62. Безрукова А.Г., Власова О.Л. Перспективы применения элементов матрицы светорассеяния для анализа состояния биомедицинских систем нано- и микрочастиц// Материалы XVII Международной научно-методической конференции «Высокие интеллектуальные технологии и инновации в образовании и науке». Т.1. — СПб.: Изд-во СПбГПУ, 2010. Т.1. С.211—212.
63. Власова О.Л. Оптические свойства радахлорина как фотосенсибилизатора в диагностике и медицине//Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. 2011. Вып.1. С.181—190.