

E. S. Yakushenko
Saint-Petersburg state electrotechnical university «LETI»

INVESTIGATION OF METHOD FOR DYNAMICS ASSESSMENT OF THE PATIENT CONDITION INDICATORS USING MULTYDAY HOLTER ECG RECORDS

Method for automatically determination of patient condition indicators significant changes with statistical criteria using multiday Holter ECG monitoring was suggested. The best result was achieved with median test for HR analysis results (at a significance level $\alpha = 0,038$), Fischer exact test for rhythms analysis results ($\alpha = 0,097$), Kolmogorov-Smirnov test with median test for arrhythmias analysis results ($\alpha = 0,057$).

Statistical criteria, therapy control, dynamics of the patient condition indicators, multiday Holter ECG monitoring

УДК 574 (07)

И. С. Захаров, А. Н. Величко
Санкт-Петербургский государственный электротехнический
университет «ЛЭТИ» им. В. И. Ульянова (Ленина)

Исследование методов формирования тест-реакции термотаксиса инфузорий

*Исследованы биологические, физические и технические факторы образования тест-реакции термотаксиса инфузорий *P. Caudatum* в контроле и при воздействии модельного токсиканта.*

Термотаксис, биотестирование, инфузория, метод, прибор

На базе биотехнологий в 1960–70 гг. возникла область приборостроения – аппаратурное биотестирование. Из этого направления к 1980–90 гг. выделилась область приборостроения микробиотестирование, использующее организмы малых размеров и малые объемы проб. Данное направление динамично развивается за рубежом [1].

В микробиотестировании широко используется реакция популяции одноклеточных организмов на внешнее воздействие. Одной из важнейших реакций живого является температурная регуляция. Одноклеточные организмы обладают реакцией популяционного приспособления к оптимальному диапазону температур за счет перемещения по тепловому градиенту [2].

Исследование температурных эффектов у популяции одноклеточных организмов является важным современным направлением в области протозоологии и биотехнологии. Можно выделить несколько этапов исследований температурных эффектов у одноклеточных:

1) конец XIX в. – 1930-е гг. – обнаружение популяционных эффектов, зависящих от температур среды одноклеточных;

2) 1970–80-е гг. – после перерыва в исследовании температурных эффектов появляется серия работ, посвященных методам искусственного формирования температурных реакций;

3) 1990–2000-е гг. – исследование возможностей управления температурными тест-реакциями с помощью биохимических и химических механизмов [3].

В результате современных исследований выявлено сходство между воздействием ряда биохимических соединений и химических веществ на температурные эффекты многоклеточных и одноклеточных организмов, что позволяет использовать одноклеточные организмы в качестве биотестовых моделей.

Актуальность исследований возможности создания приборного биотеста, основанного на температурном таксисе (направленном популяционном перемещении), определяется зависимостью

выбора одноклеточными зоны оптимальных температур от инфекций, гипоксии, ряда химических токсикантов, биохимических блокаторов метаболизма.

Термотаксис инфузорий – перемещение инфузорий под действием градиента температуры – отражает процессы терморегуляции популяции простейших и может выявлять нарушение этих процессов тепловым загрязнением. В литературе приводятся методы биологического контроля температурных загрязнений, обусловленных подогревом воды в ТЭС и АЭС.

Наиболее близким аналогом технической системы формирования и контроля тест-реакции является установка, предложенная в работе [4]. Градиент термотаксиса T_1-T_2 обеспечивается прокачиванием холодной и горячей воды через трубки, контактирующие с торцами ячейки, в центре которой находится щель для контроля движения инфузорий с помощью микроскопа. Термотаксис организуется в вязкой среде, чтобы стабилизировать температурный градиент и замедлить движение пересекающих щель клеток.

Формирование термотаксиса основывалось на эмпирических данных, а теоретические основы создания тест-реакции на основе термотаксиса не были описаны. Существующие методы контроля в основном опирались на визуальные наблюдения, а количественные критерии тест-реакции отсутствовали.

Целью данной работы является разработка основ формирования биотехнической системы для контроля токсичности водных сред на базе тест-реакции термотаксиса инфузорий. В данной статье публикуются результаты исследований факторов, влияющих на возникновение и воспроизводимость термотаксиса инфузорий *P. caudatum*, а также обоснование концепции тест-реакции, при которой термотаксис использовался в качестве физиологической нагрузки [5] при воздействии модельного токсиканта.

Для реализации принципа физиологической нагрузки тест-реакция была поделена на две фазы:

1) выдерживание инфузорий в токсической среде;

2) стимуляция термотаксиса для обнаружения токсического эффекта.

Вторая фаза выделяет действие токсикантов, которые подавляют систему терморегуляции инфузорий.

Основной метод формирования термотаксического градиента реализуется в большинстве научных работ с помощью использования льда (источника холода) и кипящей жидкости как (источник тепла).

Авторами данной статьи для первичной проверки формирования тест-реакции термотаксиса применялся метод источника холода как фактора физиологической нагрузки; в этом качестве использовалась ячейка со льдом в металлическом корпусе, прижимаемая к стенке стеклянной кюветы. В дальнейшем данный метод может быть заменен аппаратурной реализацией на базе элементов Пельтье [1].

Теоретические основы формирования тест-реакции термотаксиса базируются на положениях термодинамики с учетом эмпирических закономерностей, выявленных исследователями термотаксиса [1]–[4], [6], [7].

Термодинамическая задача сводится к определению параметров источника холода, действующего на торец кюветы, обеспечивающих необходимое снижение температуры за фиксированное время, и установления температурного градиента. Общая формула термодинамического процесса формирования тест-реакции включает учет следующих термодинамических источников: тепло, отнимаемое льдом у исследуемой среды; потери на теплопроводность ячейки; потери на охлаждение кюветы; отнимаемое тепло, обеспечивающее снижение температуры среды.

В первом приближении формула изменения температуры:

$$T_0 - T_1 = \frac{\gamma LM - \rho_1 V_1 c_1 \frac{\delta}{\lambda S} P}{\rho_2 V_2 c_2 + \rho_3 V_3 c_3},$$

где T_0 и T_1 – начальная и конечная температуры плавления льда, °С; γ – доля тепла, отнимаемого через стенку ячейки; L – удельная теплота плавления льда, кДж/кг; M – масса льда, кг; V_1, V_2, V_3 – суммарные объемы стенок кюветы, соприкасающихся с исследуемой средой, стекла кюветы и водного раствора соответственно, м³; ρ_1, ρ_2, ρ_3 – плотность ячейки, стекла кюветы и водной среды соответственно, кг/м³; c_1, c_2, c_3 – теплоемкости металлической ячейки, стекла и водного раствора соответственно, Дж/(кг · К); δ – толщина стенки, м; λ – коэффициент теплопроводности, Дж/(кг · К); S – площадь стенки ячейки, м²; P – мощность источника охлаждения, Дж;

$$LM = Pt,$$

где t – время плавления льда.

Подставляя значения, которые характеризуют условия эксперимента, получили разность температур в $4...5$ °С при воздействии льда массой 20 г, но следует учитывать, что это – установившаяся в результате теплообмена температура.

В самой кювете градиент температуры $\frac{dT}{dx}$ устанавливается за счет охладителя, теплопроводности, конвекции:

$$f\left(\frac{dT}{dx}\right) = Q_{\text{охл}} - Q_{\text{тпр}} - Q_{\text{конв.}}$$

Возникновение термотаксиса определяется, с одной стороны, распределением температуры по кювете, а с другой – особенностями терморегуляции инфузорий.

Энергия, отнимаемая за счет охлаждения у среды, приводит к понижению температуры в приграничных с источником холода слоях жидкости. Они уменьшают кинетическую энергию других молекул и увеличивают плотность жидкости, что приводит к перемещению холодных слоев вниз, а более теплых – вверх. Важно, что опускание холодных слоев происходит достаточно медленно, что уменьшает перемешивание жидкости и поддерживает температурный градиент. Дно и стенки кюветы за счет теплопроводности кварцевого стекла воздействуют на градиент температуры.

При этом температура среды не должна падать ниже критической, при которой достигается резкое замедление движения и даже гибель инфузорий, а скорость изменения температуры не должна быть меньше предельной. Линейные размеры элемента среды не должны при этом создавать турбулентности при конвекции. Чтобы уменьшить конвекцию жидкости, необходимо уменьшать толщину ее слоя или увеличивать кинематическую вязкость среды.

При проведении эксперимента фиксировалось время плавления льда (12 мин), что позволило определить время охлаждения при воздействии постоянной его мощности в течение опыта. Были проведены эксперименты для получения зависимости температуры жидкости от времени за этот заданный период времени из графика (рис. 1) следует, что температура (множество точек 1) при теплообмене в кювете при температуре среды 26 °С падает на 6 °С за 12 мин согласно экспоненциальной зависимости (кривая 2) с коэффициентом детерминации $R^2 = 92,9$ %.

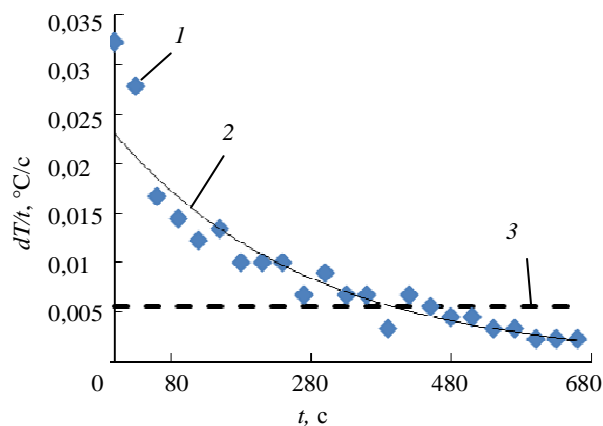


Рис. 1

Полученная скорость изменения температуры $dT/t > 0,0055$ [3], что отражает пунктирная линия (линия 3) на рис. 2. Температурные параметры таксиса зависят от начальных условий культивации. При понижении температуры растворимость газов повышается, исключая конвекцию, вызванную пузырьками.

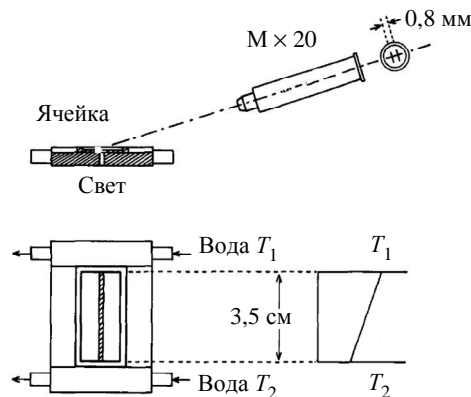


Рис. 2

Была апробирована схема проведения тест-реакции, приведенной на рис. 2. Контроль реакции осуществлялся с помощью цифровой съемки в режиме «супермакро». Инфузории по кювете распределялись с помощью программы, алгоритм которой приведен далее:

1. Подготовительный этап:
 - 1) подготовка взвеси инфузорий;
 - 2) подготовка лабораторной посуды;
 - 3) подготовка установки для фоторегистрации.
2. Формирование температурного градиента:
 - 1) горизонтальная кювета (30×20×40 мм) – холодный источник;
 - 2) холодный источник – горизонтальная кювета (30×20×40 мм) – холодный источник.

3. Регистрация тест-реакции термотаксиса.

4. Обработка полученных данных в интерактивной системе MATLAB:

- 1) загрузка изображения;
- 2) фильтрация изображения;
- 3) преобразование растрового изображения в режим градации серого;
- 4) определение яркостей пикселей (ЯП).

5. Обработка результатов опыта в приложении MS Excel:

- 1) подсчет суммы яркостей пикселей вертикальных (Σ ЯПВ);
- 2) анализ скользящего среднего Σ ЯПВ;
- 3) построение графиков.

Подготовка инфузорий осуществлялась согласно стандартным методикам, концентрация клеток составляла 1500 кл/мл. Среди биологических факторов важнейшим оказался возраст культуры, который не должен быть менее 7 дней при уменьшении возраста эффект термотаксиса не проявлялся. Этот вывод совпадает с работой [3].

Взвесь инфузорий, объемом 1 мл, помещалась в кювету размерами 30×20×40 мм (ГОСТ 20903–75), градиент в которой создавался путем охлаждения торцов кюветы при помощи двух металлических блоков со льдом. Обработка данных осуществлялась при помощи пакета прикладных программ Image Processing Toolbox в интерактивной системе MATLAB и программы MS Excel.

Опыт 1. Градиент температур создавался путем охлаждения одного торца кюветы при помощи источника, описанного выше. Съемка производилась в течение 20 мин. На рис. 3 приведен график изменения наклона функции регрессии (кривая 1), описывающей распределение яркостей пикселей по кювете от времени. Видно, что за 2 мин происходит изменение знака наклона с $-4,733$ до $8,119$ (линия 2 – линейная зависимость $y = 6,426x - 3,301$ с коэффициентом детерминации $R^2 = 87,03 \%$). Далее его знак сохраняется, но уменьшается значение наклона до близкого к 0 на 10-й минуте, которое стабилизируется в течение следующих 10 мин (кривая 3 – полиномиальная зависимость 3 степени $y = 0,0473x^2 - 1,4409x + 11,092$ с коэффициентом детерминации $R^2 = 98,63 \%$). Эти эксперименты позволили определить время экспресс-реакции термотаксиса. Статистическая проявляемость термотаксиса при данных условиях составила 100 % в 10 опытах.

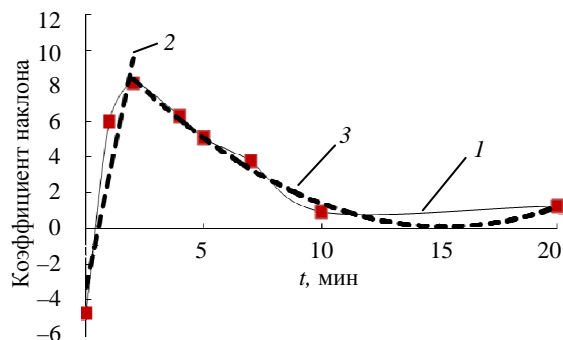


Рис. 3

Опыт 2. Основан на проверке влияния модельного токсиканта CuSO_4 (1 мг/л) на принудительное движение микроорганизмов под действием температур как физиологической нагрузки. Инфузории выдерживались в растворе токсиканта 5 мин. Градиент температур создавался путем охлаждения одного торца кюветы при помощи источника холода (рис. 4). Коэффициент наклона функции линии регрессии отражает первоначально равномерное распределение инфузорий по кювете (линия 1 – линейная зависимость $y = 1,8014x + 3491,1$), которое при воздействии низкой температуры быстро (0...2 мин) изменяется за счет ухода инфузорий от зоны более теплых температур к зоне более холодных (линия 2 – линейная зависимость $y = 10,266x + 2497,6$). После выдержки в растворе токсиканта реакция исчезает и сохраняется прежнее равномерное распределение (линия 3 – линейная зависимость $y = -0,2042x + 4129,9$), так как токсичная среда повлияла на популяцию инфузорий.

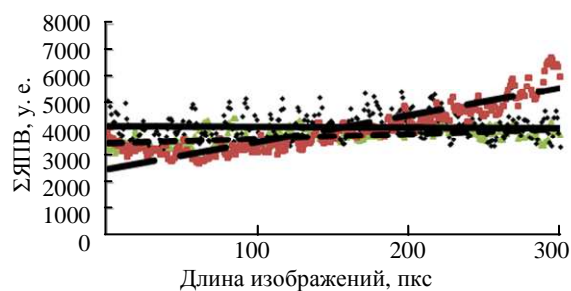


Рис. 4

В результате проделанной работы были получены следующие результаты: определен основной биологический параметр культуры – возраст инфузорий; достигнута воспроизводимость тест-реакции; определено время, за которое образуется градиент концентрации инфузорий; показано подавление движения организмов после воздействия токсикантов при действии температурного градиента.

При подготовке статьи были использованы материалы, собранные в результате работы по гранту для аспирантов вузов, отраслевых и ака-

демических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Захаров И. С., Величко А. Н. Анализ биотехнических аспектов построения биотестовой системы контроля теплового загрязнения водных сред на базе тест-реакции термотаксиса инфузорий // Сб. докл. студентов, аспирантов и молодых ученых 66-й науч.-техн. конф. профессорско-преподавательского состава СПбГЭТУ «ЛЭТИ». 2013. С. 241–244 .
2. Tawada K., Oosawa F. Responses of Paramecium to temperature change // Protozoo. 1972. № 19. P. 53–57.
3. Mavlin G. M., Cecava N., Nelin L. D. Nitric Oxide Production and Thermoregulation in Paramecium caudatum // Acta Protozoologica. Intern. J. on Protistology. 2003. Vol. 42. P. 259–67.
4. Tawada K., Miyamoto H. Sensitivity of Paramecium Thermotaxis to Temperature Change // Protozoo. 1973. № 20. P. 289–292.
5. Виноходов Д. О., Пожаров А. В. Методологические особенности токсикологических тестов с инфузориями // Изв. СПбГЭТУ «ЛЭТИ». Сер. «Биотехнические системы в медицине и экологии». 2006. № 3. С. 60–67.
6. Захаров И. С., Голядкин С. В. Перспективы применения термотаксиса микроорганизмов как тест-реакции для биотестовых систем // Изв. СПбГЭТУ «ЛЭТИ». 2008. № 9. С. 54–59.
7. Величко А. Н., Ковалевская А. С. Биотехнические методы исследования температурных реакций инфузорий // Сб. науч. работ участников международ. молодежного конкурса «Студент и научно-технический прогресс». Ростов н/Д.: Изд-во ЮФУ, 2012. Т. 2. С. 35–39.

I. S. Zakharov, A. N. Velichko
Saint-Petersburg state electrotechnical university «LETI»

STUDY METHODS OF FORMING REACTIONS TEST THERMOTAXIS CILIATES

Investigated the biological, physical and technical factors of formation test reaction thermotaxis ciliates P. Caudatum in the control and under the influence of a model toxicant.

Thermotaxis, bioassay, ciliate, method, device