

НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ

«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ

імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки

Кафедра біоінформатики

Завідувач кафедри

проф.С.В.Горобець

«___» _____ 202_р.

МАГІСТЕРСЬКА ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття ступеня магістра

зі спеціальності 162 «Біотехнологія та біоінженерія»

на тему: **«Визначення впливу лазерного випромінювання для фотодисоції карбоксигемоглобіну при курінні»»**

Виконав:

Студент групи БМ-91мп

Циктор Роман Михайлович _____

Науковий керівник:

докт. біол. наук, професор

Горго Ю.П. _____

Науковий консультант:

Директор Інституту прикладних проблем фізики та біофізики НАНУ,
к.ф.-м.н., ст.н.сп. Мамілов С.О. _____

Консультант з розробки стартап проекту,

к.е.н., доцент, Ткаченко Т.П. _____

Рецензент:

к.б.н., ст.н.співр. Гонтар Т.М. _____

Засвідчую, що у цій дипломній роботі немає запозичень з праць інших авторів без відповідних посилань.

Студент _____

Київ – 2020

Національний технічний університет України

«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»

Факультет біотехнології і біоінженерії

Кафедра біоінформатики

Рівень вищої освіти – другий (магістерський) за освітньо-професійною програмою

Спеціальність 612 Біотехнології та біоінженерія

(код і назва)

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

_____ **С.В. Горобець**

(підпис)

(ініціали, прізвище)

« ___ » _____ 2020 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу студенту

Циктору Роману Михайловичу

1. Тема роботи “Визначення впливу лазерного випромінювання для фотодисоції карбоксигемоглобіну при курінні”

Науковий керівник роботи - Горго Юрій Павлович, д.б.н., професор

затверджені наказом по університету від « ___ » _____ 20__ р. № _____

2. Термін подання студентом роботи 07.12.2020 р.

3. Об'єкт дослідження - зміни відносної концентрації сполук гемоглобіну у крові в процесі куріння.

4. Вихідні дані до роботи - *Мета роботи* – дослідження та аналіз динаміки процесів, що мають місце при взаємодії лазерного випромінювання з комплексами гемоглобіну та сполуками карбоксигемоглобіну, і впливу опромінення лазером на процес фотодисоціації цих комплексів. *Предмет дослідження* – процеси взаємодії низькоенергетичного лазерного випромінювання різних хвильових діапазонів з оксигемоглобіном та карбоксигемоглобіном в периферічних судинах курців та його оксидантного впливу.

5. Перелік завдань, які потрібно розробити:

1. Аналіз та дослідження динамічних спектрів модельної суміші гемоглобінових комплексів при зміні концентрації окремих сполук гемоглобіну.

2. Дослідження динаміки швидких змін відносної концентрації сполуки карбоксигемоглобіну у крові курців під час паління.

3. Виявити особливості використання низькоенергетичного лазерного випромінювання для детоксикації отруєння чадним газом при палінні.

4. Розробити стартап проект по створення пристрою пульсоксиметричного типу для вимірювання концентрації карбоксигемоглобіну *in vivo* та при використанні

лазерного опромінення для корекції та профілактики наслідків куріння та отруєння чадним газом.

6. Перелік ілюстративного матеріалу - плакати, презентація, слайди.

7. Орієнтовний перелік публікацій немає

8. Консультанти розділів роботи*

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		завдання видав	завдання прийняв
Експериментальна частина	К.ф.-м.н.,ст.н.сп. Мамілов С.О Директор Інституту прикладних проблем фізики та біофізики НАН України		
Розробка стартап - проекту	Доц., к.е.н. Ткаченко Т. П.		

9. Дата видачі завдання 27 листопада 2020

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапів роботи	Примітка
1.	Визначення предмету дослідження	2. 11. 2020	виконано
2.	Характеристика об'єкту дослідження	5. 11. 2020	виконано
3.	Підготовка огляду літератури	13. 11. 2020	виконано
4.	Визначення і опис методів дослідження	16. 11. 2020	виконано
5.	Підготовка експериментальної частини	23. 11. 2020	виконано
6.	Аналіз отриманих результатів	26. 11. 2020	виконано
7.	Розроблення стартап проекту	1.12. 2020	виконано
8.	Оформлення магістерської дисертації	07.12. 2020	виконано

Студент

(підпис)

Р. М. Циктор

(ініціали, прізвище)

Керівник роботи

(підпис)

Ю.П.Горго

(ініціали, прізвище)

* Якщо визначені консультанти. Консультантом не може бути зазначено наукового керівника магістерської дисертації.

РЕФЕРАТ

Дипломна робота: 97 стор., 57 рис., 13 табл., 65 посилань

Актуальним питанням охорони здоров'я та сучасної медицини можна зазначити вплив на ступінь оксигенації крові і здоров'я людини вживання тютюнових виробів через вдихання продуктів куріння. Це можливо шляхом визначення вмісту карбоксигемоглобіну в крові та застосування методів зниження або мінімізації наслідків куріння. Тому розробка методів та засобів неінвазивного визначення вмісту карбоксигемоглобіну в крові та детоксикації при отруєнні курців і не курців є актуальною задачею.

Метою даної роботи було дослідження та аналіз динаміки впливу лазерного випромінювання на комплекси гемоглобіну –карбоксигемоглобіну, та визначення дії лазерного випромінювання для спричинення фотодисоціації карбоксигемоглобіну в процесі куріння. До групи ризику, крім курців, були віднесені пасивні курці, в яких також спостерігається підвищений вміст карбоксигемоглобіну. Досліджувались процеси, які мають місце при взаємодії лазерного випромінювання різних хвильових діапазонів із комплексами гемоглобіну, та їх подальшою дисоціацією.

Були визначені зміни відносної концентрації оксигемоглобіну у крові, периферичних тканинах кінцівок та м'яких тканинах людини, які були доступними для опромінювання низькоенергетичним лазером. В роботі також визначено ступінь впливу низькоенергетичного лазерного випромінювання різних хвильових діапазонів для фотодисоції карбоксигемоглобіну при курінні.

ABSTRACT

Thesis: 97 pages, 57 fig., 13 table, 65 references

One of the current problems in health care and modern medicine include the impact on the degree of oxygenation of blood and human health of tobacco use through inhalation of smoking products. This is possible by determining the content of carboxyhemoglobin in the blood and using methods to reduce or minimize the effects of smoking. Therefore, the development of methods and tools for non-invasive determination of carboxyhemoglobin in the blood and detoxification in poisoning of smokers and non-smokers is an urgent task.

The aim of this work was to study and analyze the dynamics of the effect of laser radiation on hemoglobin-carboxyhemoglobin complexes, and to determine the effect of laser radiation to cause photodissociation of carboxyhemoglobin in the smoking process. The risk group, in addition to smokers, included passive smokers, who also have elevated carboxyhemoglobin levels. The processes that take place during the interaction of laser radiation of different wavelengths with hemoglobin complexes and their subsequent dissociation were studied.

Changes in the relative concentrations of oxyhemoglobin in blood, peripheral limb tissues, and human soft tissues that were available for irradiation with a low-energy laser were determined. The degree of influence of low-energy laser radiation of different wave ranges for photodissociation of carboxyhemoglobin during smoking is also determined in the work.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

HbO₂ – оксигемоглобін;

HbCO – карбоксигемоглобін;

FHb – фетальний гемоглобін;

2,3-ДФГ – 2,3-дифосфогліцерат;

HbA – гемоглобін «А»;

ЕКГ – електрокардіографія;

ПВЗ – пристрій вибірки і зберігання;

ЦАП - цифро-аналогового перетворювача;

АЦП – аналогово-цифровий перетворювач;

ІЧ область– інфрачервона область;

ВЗМО – вища зайнята молекулярна орбіталь.

ЗМІСТ	
ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	6
ЗМІСТ	7
ВСТУП.....	9
1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ	12
1.1. Будова, властивості та форми гемоглобіну	12
1.2. Крива дисоціації оксигемоглобіну	19
1.3. Отруєння чадним газом і карбоксигемоглобін	22
1.4. Всмоктування і метаболізм CO	24
1.5. Виведення CO з організму	26
1.6. Наслідки для здоров'я	27
1.7. Визначення статусу оксигенації крові	29
2. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ	31
2.1. Спектрофотометричні методи аналізу форм гемоглобіну	31
2.3. Метод фотодисоціація комплексів гемоглобіну	35
3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА	49
3.1. Дослідне визначення концентрації карбоксигемоглобіну у курців ..	49
3.2 Програмне забезпечення для обрахування SaO₂ і HbCO.....	55
3.2. Дослідження характеру змін концентрації карбоксигемоглобіну під час паління	57
3.3. Визначення та аналіз змін та характеру фізичних процесів в комплексах гемоглобіну при взаємодії з лазерним випромінюванням	60
3.5. Зміни точності вимірювань сатурації крові за рахунок впливу карбоксигемоглобіну	77
4. РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ	81
4.1 Резюме	81

4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища підприємства	82
4.2.1 Загрози і можливості зовнішнього середовища	82
4.2.2 Переваги та недоліки внутрішнього середовища	83
4.2.3 Місце розробки у системі цінностей підприємства методом Бостонської матриці.....	84
4.2.4 Аналіз потенційного ринку збуту і конкуренції середовища за методом квадрату Бове.....	84
4.3 Ключові фактори успіху.....	85
4.4.2 Джерела фінансування НДР.....	85
4.4.3 Розрахунок пропозиції.....	85
4.5 Ризики і страхування	89
ВИСНОВКИ.....	91
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	92

ВСТУП

Досить актуальним та одним із важливих питань охорони здоров'я населення всіх країн світу та сучасної медицини є негативні наслідки, що викликані палінням. В продовж процесу куріння концентрації карбоксигемоглобіну в крові можуть досягати пікових 6-8 % в залежності від кількості викурених до цього сигарет та особливостей фізіологічного стану організму, що наносить відчутну шкоду організму через зменшену оксигенацію крові. Але вищий від норми вміст карбоксимоглобіну в крові це проблема не тільки курців, але й великою мірою людей, які в міру обставин вдихають продукти куріння, стаючи при цьому пасивними курцями і отримують негативні наслідки на рівні з курцями. Існують різні методи визначення ступеня концентрації оксигемоглобіну та карбоксигемоглобіну в крові [1-7], але майже всі вони інвазивні і складні у використанні. Тому розробка методів та засобів неінвазивного визначення вмісту карбоксигемоглобіну в крові та детоксикації шляхом фотодисоціації при отруєнні курців і не курців є *актуальною задачею*, і не тільки для проблем, пов'язаних з курінням.

Мета роботи – дослідження та аналіз динаміки процесів, що мають місце при взаємодії лазерного випромінювання з комплексами гемоглобіну та сполуками карбоксигемоглобіну, і впливу опромінення лазером на процес фотодисоціації цих комплексів.

У відповідності до мети були поставлені наступні **завдання**:

1. Аналіз та дослідження динамічних спектрів модельної суміші гемоглобінових комплексів при зміні концентрації окремих сполук гемоглобіну.
2. Дослідження динаміки швидких змін відносної концентрації сполуки карбоксигемоглобіну у крові курців під час паління.
3. Виявити особливості використання низькоенергетичного лазерного випромінювання для детоксикації отруєння чадним газом при палінні.
4. Розробити стартап проект по створення пристрою пульсоксиметричного типу для вимірювання концентрації карбоксигемоглобіну *in vivo* та при використанні

лазерного опромінення для корекції та профілактики наслідків куріння та отруєння чадним газом.

Предмет дослідження – процеси взаємодії низькоенергетичного лазерного випромінювання різних хвильових діапазонів з оксигемоглобіном та карбоксигемоглобіном в периферичних судинах курців та його оксидантного впливу.

Об'єкт дослідження – зміни відносної концентрації сполук гемоглобіну у крові в процесі куріння.

Методи дослідження. В роботі було використано два методи дослідження зміни вмісту оксигемоглобіну та карбоксигемоглобіну при курінні:

- базовий метод пульсової оксиметрії, який спирається на вимірювання коефіцієнтів модуляції двох довжин хвиль,
- спектрофотометрія поглинання похідних гемоглобіну – відновленого Нb, оксигемоглобіну НbO₂ і карбоксигемоглобіну НbCO у видимій області.

Наукова новизна. Вперше проведені дослідження на волонтерах - курцях та некурцях, які показали достовірну різницю між відношеннями коефіцієнтів модуляції сигналів зеленого, червоного та ІЧ каналів у некурців та курців з відповідними значеннями вмісту карбоксигемоглобіну в крові.

Новим є визначення, що в поверхневих шарах шкіри спостерігається максимальний ефект падіння концентрацій НbO₂ і НbCO при лазерному опроміненні в зеленій області спектру.

Вперше показано, що, у випадку помірних концентрацій карбоксигемоглобіну від 10% до 20%, для детоксикації доцільним є опромінення лазером кровоносних судинах *in vivo* з використанням довжин хвиль в області від 600 до 950 нм.

Практична цінність. Розроблені датчики і вимірювальна апаратура дозволяють проводити неінвазивне визначення відносної концентрації карбоксигемоглобіну в крові людини при курінні та використати його в

подальшому для детоксикації отруєння чадним газом та створення нових методів керованої лазерно-стимульованої корекції.

Дослідження швидких змін малих концентрацій комплексів гемоглобіну методом диференціальної спектроскопії дозволяють визначати відносну концентрацію окремих комплексів гемоглобіну в периферичних судинах курців та людей, що працюють в екстремальних умовах.

Експериментальна частина роботи проводилась в Інституті прикладних проблем фізики та біофізики НАН України.

1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Будова, властивості та форми гемоглобіну

Гемоглобін є залізовмісним глобулярним білком в еритроцитах, що переносить молекулярний кисень від легень до тканин в організмах хребетних тварин [1]. В тканинах гемоглобін вивільняє кисень для аеробного забезпечення енергією живлення функцій організму в процесі метаболізму. У здорової особи міститься від 120 до 160 г гемоглобіну на 1 л крові. У ссавців гемоглобін становить приблизно 96% сухого вмісту еритроцитів (за вагою) і приблизно 35% загального вмісту. Гемоглобін має кисневмісну здатність 1,34 мл O₂ на грам, що збільшує загальну кисневу ємність крові в сімдесят разів порівняно з розчиненим у крові киснем. Молекула гемоглобіну ссавців може зв'язувати до чотирьох молекул кисню. Емпірична хімічна формула найбільш поширеного людського гемоглобіну C₂₉₅₂H₄₆₆₄N₈₁₂O₈₃₂S₈Fe₄, молекулярна маса гемоглобіну людини – близько 66,8 кДа.

Загалом гемоглобін може бути насичений молекулами кисню (оксигемоглобін), або ненасичений киснем (деоксигемоглобін). Оксигемоглобін утворюється під час фізіологічного дихання, коли кисень зв'язується з гемовим компонентом гемоглобіну в еритроцитах. Цей процес відбувається в легневих капілярах, прилеглих до альвеол легенів. Зв'язаний кисень переноситься потоком крові і вивільняється в клітинах, де він використовується як кінцевий акцептор електронів при виробництві АТФ в процесі окислювальної фосфорилляції. Деоксигемоглобін є формою гемоглобіну без зв'язаного кисню. Спектри поглинання окси- та деоксигемоглобіну відрізняються. Оксигемоглобін має значно менше поглинання в області 660 нм, ніж деоксигемоглобін, тоді як при 940 нм його поглинання трохи вище. Деоксигемоглобін парамагнітний; він слабо притягується магнітним полем. На відміну від нього, оксигемоглобін демонструє діамагнетизм, слабке відштовхування від магнітного поля [2].

Молекула гемоглобіну складається з чотирьох білкових субодиниць: двох α і двох β – і відповідно має чотири поліпептидні ланцюжки двох сортів. Кожна субодиниця гемоглобіну містить одну небілкову, так звану простетичну, групу – гем. Гем є комплексом заліза Fe(II) з протопорфірином. Комплекс, складений з одного гема й одного α - або β -поліпептидного ланцюга, має назву одиниці Сведберга [1]. Гемова група складається з іону заліза, що тримається в гетероциклічному кільці, відомому як порфірин. Структура гему представлена на рис.1.1 а. Порфіринове кільце складається з чотирьох молекул піролу, циклічно зв'язаних між собою (за допомогою метинових містків), які утримують іон заліза у центрі кільця. Іон заліза, який є місцем зв'язування кисню, може утворювати шість координаційних зв'язків. Чотири зв'язки спрямовані до атомів азоту пірольних кілець які лежать в одній площині, два зв'язки, що залишилися – перпендикулярно до площини порфіринового кільця по обидві його сторони. Залізо міцно (ковалентно) зв'язане з глобулярним білком через N-атоми імідазольного кільця залишку гістидину (також відомого як проксимальний гістидин) під порфіриновим кільцем. Шоста позиція може зворотно зв'язувати кисень координаційним ковалентним зв'язком, завершуючи октаедральну групу з шести лігандів. Геми розташовані поблизу поверхні білкової глобули в спеціальних кишнях, утворених складками поліпептидних ланцюжків глобіну.

В деоксигемоглобіні залізо знаходиться в закисній формі Fe(II), один із двох зв'язків, перпендикулярних до площини порфіринового кільця, спрямований до атома азоту гістидинового залишку, а другий зв'язок вільний (рис. 1.1). Крім цього гістидинового залишку, названого проксимальним (ближнім), з іншого боку порфіринового кільця і на більшій відстані від нього знаходиться інший гістидиновий залишок – дистальний гістидин, не зв'язаний безпосередньо з атомом заліза. Взаємодія молекулярного кисню з вільним гемом призводить до незворотного окислення атома заліза гему (Fe(II) \Rightarrow Fe(III); гем \Rightarrow гемін). У деоксигемоглобініглобін захищає залізо гему від окислення.

Оборотне приєднання кисню (оксигенація), що дозволяє гемоглобіну виконувати свою основну функцію носія, забезпечується можливістю утворювати міцні п'ятий і шостий координаційні зв'язки і переносити електрон на кисень не від заліза (тобто окислювати Fe^{2+}), а від імідазольного кільця проксимального гістидину. Це схематично зображено на рис. 1.1 в.

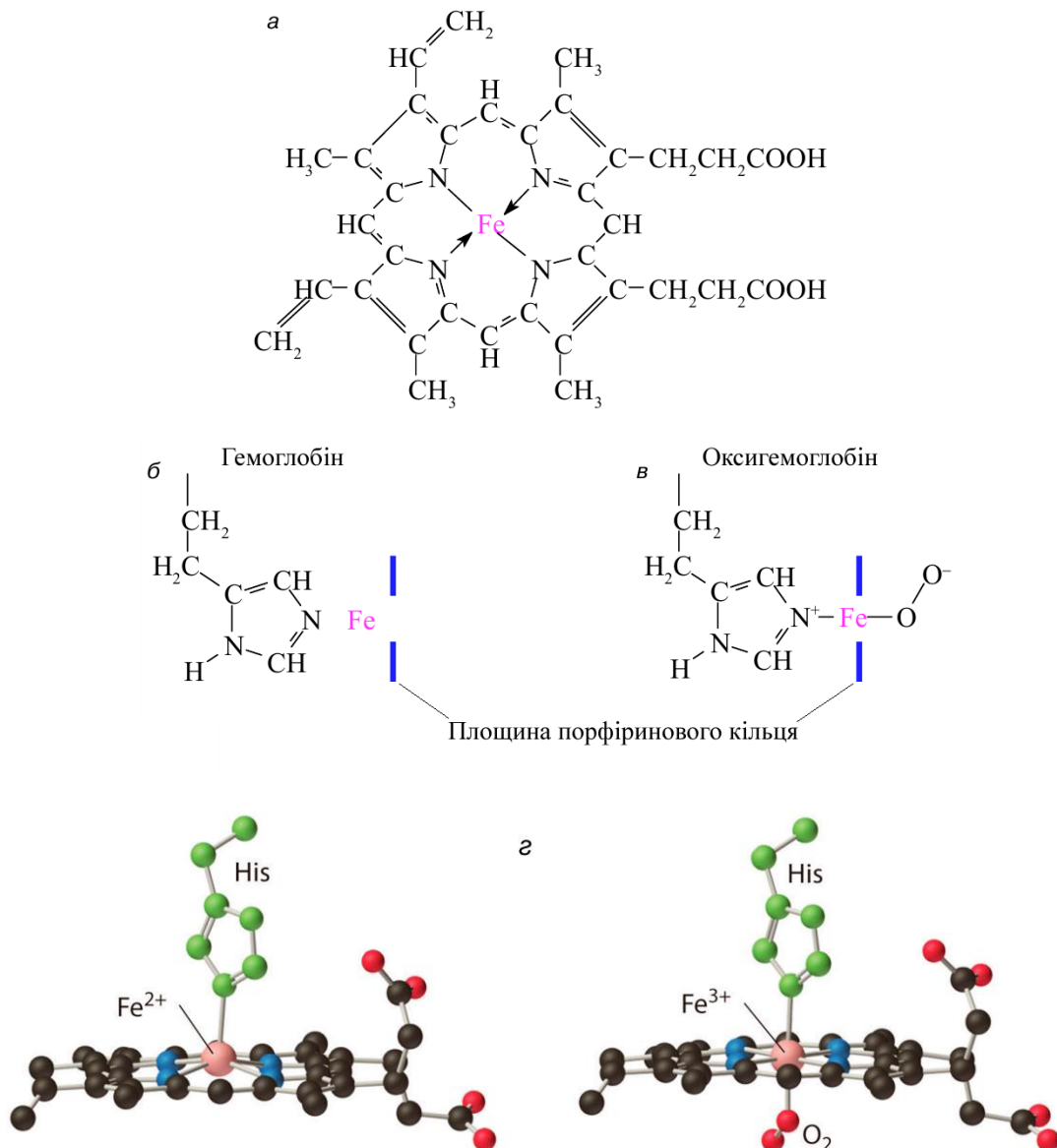


Рис. 1.1. Структура гему (а), структура активного центру деоксигемоглобіну (б), структура активного центру оксигемоглобіну (в) та 3d-модель приєднання кисню до гему (г) [3].

В молекулі деоксигемоглобіну залізо віддалене від площини порфіринового кільця приблизно на $0,5\text{--}0,6 \text{ \AA}$ (є невеликі відмінності між α - і β -субодиницями). З шести $3d$ електронів заліза Fe(II) два електрони спарені на одній з нижчих d -орбіталей, а чотири електрони займають решту d -орбіталей, їхні спіни паралельні і сумарний спін $S = 2$. Спектр поглинання в зеленій області має характерну смугу з $\lambda_{\text{max}} \sim 556 \text{ нм}$ (рис. 1.2). Приєднання кисню веде до значних змін. Атом заліза в оксигемоглобіні лежить практично в площині порфіринового кільця (відстань до площини складає $0,16 \text{ \AA}$ в α - і $0,00 \text{ \AA}$ в β -субодиницях). Усі шість d -електронів спарені на трьох нижчих d -орбіталах, $S = 0$, оксигемоглобін діамагнітний. В зеленій області спектру є дві характерні смуги поглинання: а ($\lambda_{\text{max}} = 576 \text{ нм}$) і б ($\lambda_{\text{max}} = 542 \text{ нм}$).

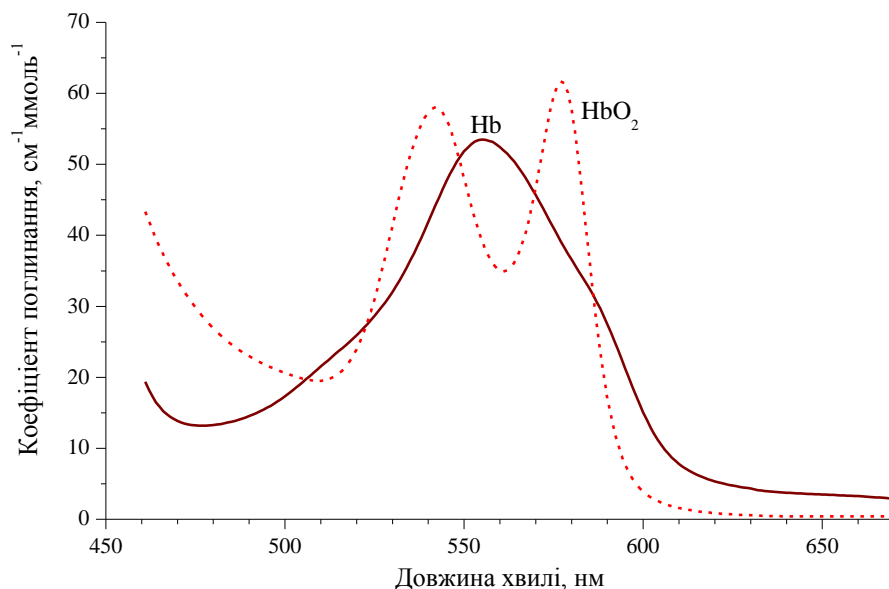


Рис.1.2. Спектри поглинання деоксигемоглобіну Hb та оксигемоглобіну HbO₂ у видимій області спектру.

Для гемоглобіну постулюється наявність двох станів: R (від англ. relaxed) і T (tensed) [4]. Стан R характеризується високою, а T – низькою спорідненістю до O₂ (сильніше і слабкіше зв'язують молекулярний кисень відповідно). Структурні зміни в активному центрі (поблизу гема) приводять і до значних змін просторової структури всього білку. При оксигенації (перехід від T- до R-форми) зміщення окремих амінокислотних залишків досягає 7 \AA . Як вже було сказано вище, четвертинна структура гемоглобіну характеризується наявністю

чотирьох поліпептидних ланцюгів, які утворюють дві α - і дві β -субодиниці. Більш детальні дослідження показали, що субодиниці утворюють $\alpha\beta$ -димери. $T \Leftrightarrow R$ -перехід супроводжується поворотом одного димеру відносно іншого на $12\text{--}15^\circ$ і в кінцевому випадку призводить до збільшення кишень, в яких знаходяться геми. Ці структурні зміни ініціюються приєднанням першої молекули O_2 до одного з вільних гемів і розповсюджуються на всю глобулу. Саме тому в рівноважній суміші завжди присутні тільки T - і R -форми. Ці димери в T -формі стягуються 14 додатковими (в порівнянні з R -формою) сольовими містками (водневі зв'язки між іонними або нейтральними групами амінокислот, ван-дер-ваальсові контакти). Крім того, між β -субодиницями в T -формі приєднується молекула дифосфогліцерата, що також призводить до звуження кишень.

На рис. 1.3 показана схематична візуальна модель переходу молекули гемоглобіну від T - до R -форми в процесі зв'язування кисню, що показує всі чотири мономери та геми, а також білкові ланцюжки у вигляді схематичних спіралей. Кисень у цій моделі не показаний, але він зв'язується з кожним з чотирьох атомів заліза (червоні кульки) у плоскому гемі. Наприклад, у верхній лівій частині, кисень зв'язується зліва від атома заліза. Це призводить до того, що атом заліза переміщується назад у гем, який його тримає (у даному випадку рухається вгору), підтягуючи ближче гістидиновий залишок (червоний п'ятикутник справа від заліза), а також білковий ланцюг, що тримає гістидин [5].

Тригером для всіх описаних вище структурних перебудов при переходах між T - і R -формами служить приєднання або відщеплення кисню. Після локального елементарного хімічного акту: приєднання або відщеплення низькомолекулярного ліганда, окислення заліза при утворенні ферігемоглобіну – виникає нерівноважний конформаційний стан. Наступна релаксація всієї молекули білка може займати мікросекунди або мілісекунди. У ході цієї релаксації міняються не тільки фізичні, але і хімічні властивості білка. Релаксація гема і його найближчого оточення з віддаленням заліза від площини

порфіринового кільця займає при кімнатній температурі десятки мікросекунд, а повна релаксація всієї білкової глобули до рівноважної Т-форми деоксигемоглобіну – сотні мілісекунд.

У спробі пояснити, як кисень може досягати явно прихованого атому гемового заліза, після розшифровки рентгенівської структури молекули міоглобіну Mb була запропонована гіпотеза так званого гістидинового затвору. Згідно цієї гіпотези, що для того, щоб кисень міг досягти дистальної порожнини гему, гістидиновий амінокислотний залишок HisE7 повинен повернути свої бокові ланцюги до розчинника, відкриваючи тим самим безперешкодний шлях для ліганду (рис1.4).

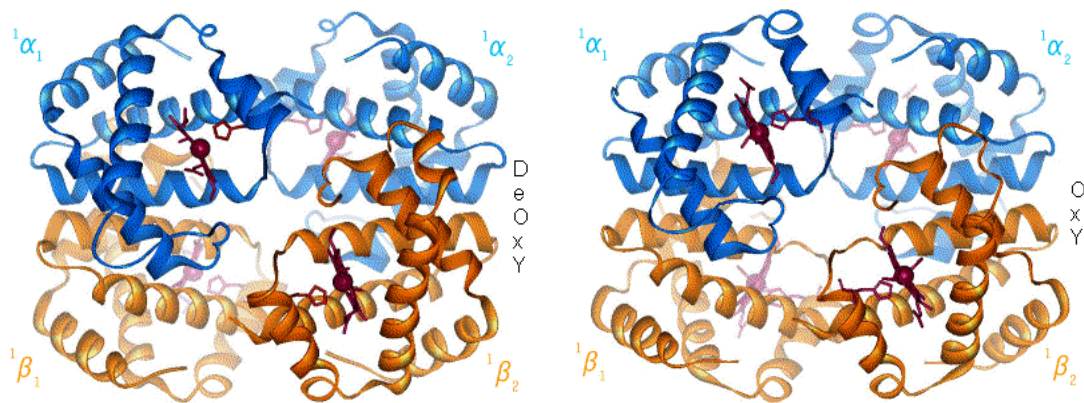


Рис.1 3. Схематична візуальна модель переходу молекули гемоглобіну від Т- до R-форми в процесі зв'язування кисню [5].

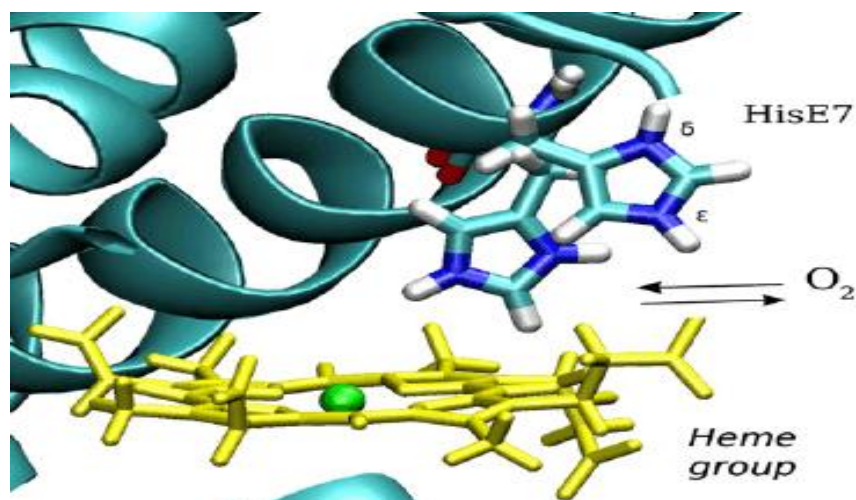
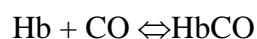
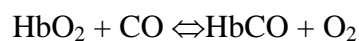


Рис. 1.4. Схематичне подання гіпотези гістидинового затвору, в якій молекулярний кисень може входити до і виходити з дистальної кишені за рахунок руху бічного ланцюжка HisE7. Показані як внутрішня (замкнена), так і зовнішня (відкрита) конформація бічного ланцюжка HisE7 [6].

Ще одна особливість, виявлена рентгеноструктурним аналізом Mb, пов'язана з наявністю порожнин всередині білкової матриці. Ці порожнини були охарактеризовані як гідрофобні порожнини, або так звані ксенонові (Xe) ділянки, вперше виявлені в експериментах з кристалічним Mb в атмосфері ксенону, через їх здатність утримувати атоми Xe. Міоглобін, як і α - та β -субодиниці гемоглобіну, має, крім дистальної кишені, щонайменше 4 Xe-сайти. Ці гідрофобні порожнини розташовані навколо гема, причому Xe1 знаходиться поряд з проксимальним HisF8. Наявність цієї тунельної системи порожнин в Mb припускає альтернативні варіанти шляхів входу та виходу ліганду [7]. Незалежно від цієї можливості існує загальний консенсус щодо того, що HisE7-затвор є одним з головних шляхів введення лігандів в Mb. У нещодавніх дослідженнях переглядається гіпотеза HisE7 з точки зору введення O₂ у канал E7 за допомогою гідрофобного ефекту [6]. Гідрофобна ділянка уздовж тунелю E7 створює яму вільної енергії, яка допомагає залучити поглинання кисню, коли HisE7 відкритий.

Структура білка в гемоглобіні така, що вона екранує підхід до атома Fe(II) всіх інших молекул, що містяться в крові, і вчасно регулює його донорно-акцепторні властивості. Виключення складають токсиканти крові, до яких відносяться монооксид вуглецю, оксиди азоту, метиленовий синій. Проникаючи з атмосферним повітрям у легені, монооксид вуглецю швидко переборює альвеолярно-капілярну мембрану, розчиняється в плазмі крові, дифундує в еритроцити і вступає в оборотну хімічну взаємодію як з окси-, так і з деоксигемоглобіном:



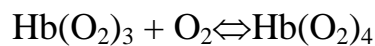
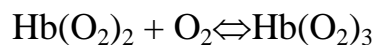
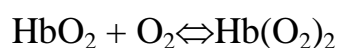
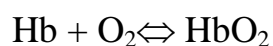
Утворений комплекс, карбоксигемоглобін(HbCO), не здатний приєднувати до себе кисень. У молекулі гемоглобіну CO координується атомом Fe(II), витісняючи O₂. Одна молекула гемоглобіну може приєднати до чотирьох молекул CO. Оскільки CO має набагато більшу спорідненість (у 200–250 разів)

до гемоглобіну в порівнянні з O_2 , навіть невеликі його концентрації призводять до порушення здатності гемоглобіну транспортувати кисень [8]. Токсична дія окису вуглецю зумовлена саме його високою спорідненістю до гемоглобіну. Для зв'язування половинної кількості гемоглобіну досить вмісту 0,1% окису вуглецю у вдихуваній атмосфері.

Існує такий продукт деградації гемоглобіну, як сульфгемоглобін, що утворюється при зв'язку атома сірки з пірольною групою порфіринового кільця. Сульфгемоглобін з'являється в крові при отруєннях сполуками сурми, бромом, нітратами, сірчаними сполуками та деякими іншими [11]. Крім згаданих форм гемоглобіну існує ще одна – карбгемоглобін, який бере участь у переносі частини (15-20%) CO_2 від тканин до легень і є дуже нестійкою сполукою, яка швидко дисоціює у легеневих капілярах з утворенням вуглекислого газу. Форми гемоглобіну, нездатні переносити кисень, часто називають дисгемоглобінами [12].

1.2. Крива дисоціації оксигемоглобіну

Оскільки одна молекула гемоглобіну має чотири субодиниці і, як наслідок, чотири геми, кожний з яких може оборотно приєднати молекулу кисню, реакцію оксигенації можна розділити на чотири стадії:



Зв'язування кисню гемоглобіном носить кооперативний характер, що відображається кривою дисоціації кисню (рис 1.5) [11]. Крива дисоціації зв'язує сатурацію гемоглобіну з напругою кисню P_{O_2} . При високих парціальних тисках кисню, що мають місце в легенях, O_2 зв'язується з гемоглобіном, утворюючи HbO_2 . При циркуляції еритроцитів через тканини HbO_2 вивільняє O_2 у відповідь на зниження парціального тиску кисню. Кооперативність зв'язування надає

кривій дисоціації кисню S-подібну форму. Сила зв'язку O_2 кожної наступної субодиниці крок за кроком зростає, так що при нормальній напрузі O_2 у легеневих альвеолах гемоглобін повністю насичується киснем. Той же процес працює і у зворотному напрямку: як тільки повністю насичений гемоглобін вивільняє одну молекулу, полегшується вивільнення інших.

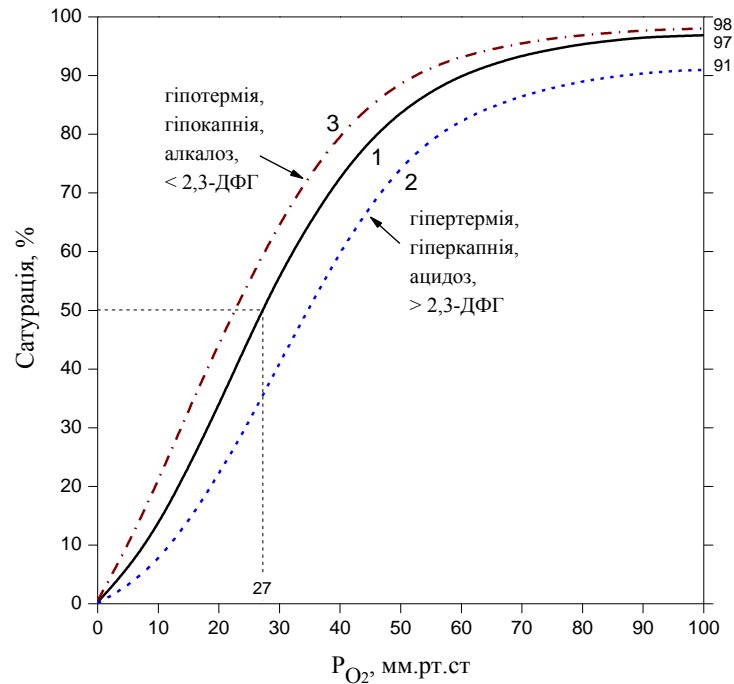


Рис.1.5. Крива дисоціації кисню для гемоглобіну. 1 – норма; 2 – зсув вправо (при зниженні рН, підвищенні температури, рівня CO_2 , вмісту 2,3-дифосфогліцерату); 3 – зсув вліво (при підвищенні рН, зниженні температури, рівня CO_2 , вмісту 2,3-ДФГ)

У вихідній точці кривої, коли $P_{O_2} = 0$, гемоглобін не містить кисню, і SaO_2 також дорівнює нулю. В міру підвищення P_{O_2} гемоглобін починає швидко насичуватися киснем, перетворюючись на оксигемоглобін; невеликого збільшення напруги кисню виявляється достатнім для істотного приросту вмісту HbO_2 . При 40 ммрт.ст. вміст HbO_2 досягає вже 75%. Потім нахил кривої стає дедалі більш пологим. На цій ділянці кривої гемоглобін вже менш охоче приєднує до себе кисень, і для насичення 25% Hb , що залишилися, потрібне підвищення P_{O_2} з 40 до 150 ммрт.ст. В природних умовах гемоглобін артеріальної крові ніколи не насичується киснем повністю, тому що при диханні атмосферним повітрям P_{O_2} не перевищує 100 ммрт.ст. Нормальному ($T = 37^\circ C$, $pH = 7,4$) рівню P_{O_2} артеріальної крові (92-98 ммрт.ст.) відповідає SaO_2

94-98%. Досягти повного насичення гемоглобіну киснем можна тільки за допомогою збільшення вмісту кисню у газі, що вдихається.

Проходячи через капіляри, артеріальна кров віддає тканинам частину кисню, що міститься в ній, і перетворюється у венозну ($P_{O_2} = 40$ ммрт.ст., $SaO_2 = 75\%$). При цьому гемоглобін віддає тканинам 23% зв'язаного кисню (ступінь оксигенації міняється від 98 до 75%). Таким чином, у газообміні бере участь лише близько 25% запасу кисню артеріальної крові, а сатурація і десатурація гемоглобіну відбуваються на пологій ділянці кривої дисоціації. При відсутності гем-гем взаємодії для одногогемового міоглобіну ця величина не перевищує 5%. Тому міоглобін служить не носієм, а депо кисню і віддає його тканини при гіпоксії, коли насичення тканини киснем падає до неприпустимо низького значення.

Значення парціального тиску кисню P_{O_2} , при якому спостерігається напівнасичення гемоглобіну киснем O_2 (сатурація дорівнює 50%), позначається як P_{50} (рис. 1.5). P_{50} зворотно співвідноситься зі спорідненістю до O_2 і є показником спорідненості гемоглобіну до кисню. Значення P_{50} у різних організмів істотно відрізняється, але у всіх випадках воно перевищує значення парціального тиску кисню в периферичних тканинах організму. Це добре ілюструє фетальний гемоглобін людини (FНb). Для HbA (гемоглобін дорослих, від англ. adult) $P_{50} = 26-28$ мм рт.ст., а для FНb $P_{50} = 20$ ммрт.ст. Завдяки цій різниці гемоглобін FНb відбирає кисень у HbA, що знаходиться в плацентарній крові. Однак після народження дитини FНb втрачає свою функцію; маючи більш високу спорідненість до кисню, він вивільняє меншу його кількість у тканинах.

Зростання концентрацій HbCO і MetHb є небезпечним з двох причин: а) HbCO і MetHb придушують транспорт O_2 , блокуючи залізо-зв'язуючі ділянки гема, і б) при зв'язуванні одного або більше атомів заліза з монооксидом вуглецю або їхньому окисленні конформація гемоглобіну міняється таким чином, що спорідненість гемових груп, які залишилися, до O_2 зростає, що приводить до зсуву кривої дисоціації вліво і зменшення доставки O_2 до тканин.

1.3. Отруєння чадним газом і карбоксигемоглобін

Отруєння чадним газом відбувається при вдиханні повітря з підвищеним вмістом чадного газу (CO). Симптоми часто характеризуються як грипоподібні і включають головний біль, запаморочення, слабкість, блювоту, біль у грудях та плутаність свідомості. Великі експозиції можуть спричинити втрату свідомості, аритмії, судоми або смерть [13]. Зрідка зустрічається класичний симптом “вишнево-червоної шкіри”. Довготривалі ускладнення можуть включати відчуття втоми, проблеми з пам’яттю та проблеми з рухом.

Більшість населення попадає під вплив відносно низької концентрації чадного газу у навколишньому середовищі, що призводить до середнього рівня карбоксигемоглобіну в крові менше 2%. Підвищені концентрації CO можуть виникати в місцях з інтенсивним рухом транспорту, а також у домашніх і виробничих умовах. Тимчасові піки концентрації CO (до 50 млн⁻¹ і більш) виникають у місцях з напруженим вуличним рухом багатьох великих міст, шкідливо впливаючи на здоров’я людей, які проводять багато часу на вулиці.

Отруєння чадним газом часто є причиною номер один з усіх смертей від отруєнь [14]. Найбільший внесок у число смертей, пов’язаних з отруєнням CO, вносять пожежі, автомобільні вихлопні гази і побутові джерела горіння – кухонні газові плити, нагрівачі, котли, каміни і т.п.

На рис. 1.6 наведено статистику виїздів бригад швидкої допомоги на різні події [15], пов’язані з отруєнням чадним газом у Лондоні та трьох районах Англії у 2009-2011 рр. Потерпілих доставляли у відповідні медичні центри, кожен з яких був оснащений CO-пульсоксиметром Masimo RAD-57 та чотирма моніторами видихуваного повітря ToxCO.

На рис.1.6А показаний відсоток пацієнтів, які контролювалися при цих інцидентах протягом вказаного періоду. До категорії “Інше” відносяться особи, які використовували деревне вугілля для опалення, пошкоджені побутові плити та особи, які зазнали дії CO і скаржились на симптоми отруєння дещо пізніше, коли джерело не могло бути ідентифікованим. На рис. 1.6 Б показаний відсоток пацієнтів, у яких рівень карбоксигемоглобіну в крові більш як на 5%

перевищував очікуваний, з урахуванням курців з одвічно підвищеним фоновим рівнем НbCO. Статистика показує, що, при найбільшому внеску пожеж у випадки отруєнь CO, найвищий ризик пов'язаний з використанням домашніх нагрівальних пристроїв, що працюють на вуглеводнях.

Найбільш важливі наслідки для здоров'я, пов'язані з впливом CO, обумовлені його сильним зв'язком з молекулою гемоглобіну з утворенням карбоксигемоглобіну. Кожна частинка/млн CO приводить до зв'язування з 0,165% гемоглобіну крові. Карбоксигемоглобін знижує здатність крові до переносу кисню, накладаючи напругу на тканини з підвищеною потребою в кисні, таких як серце і мозок.

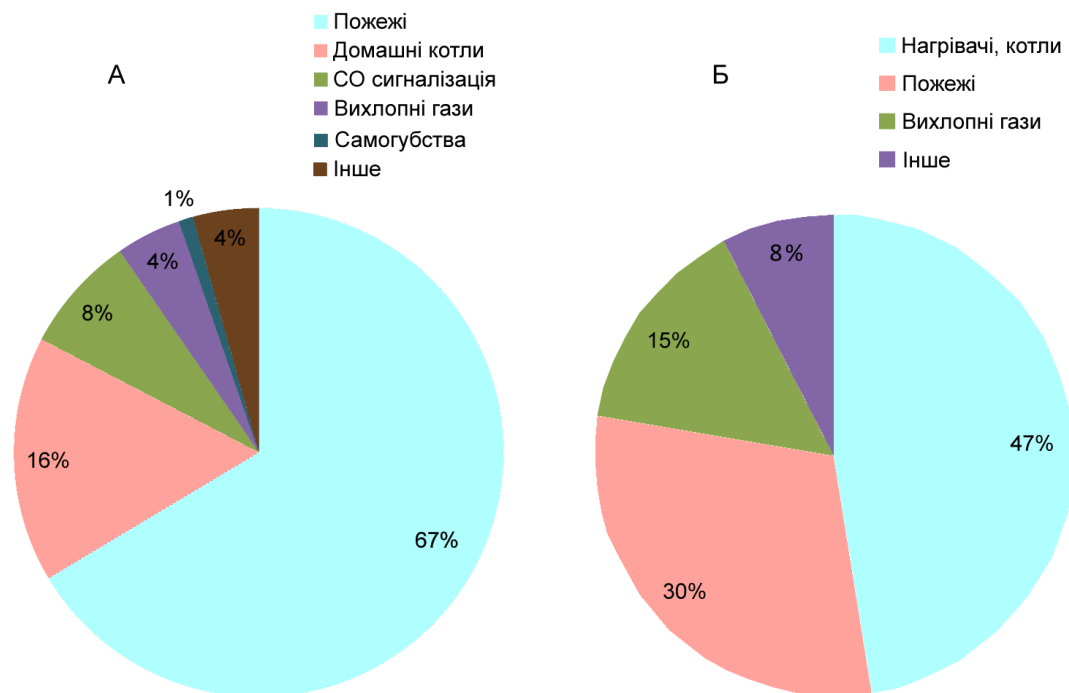


Рис. 1.6. Розподіл частоти різних інцидентів, пов'язаних з отруєнням CO в Англії в 2009-11 рр. (А) та відсоток пацієнтів з підвищеним ризиком після отруєння (Б) [15].

Особливою групою людей, що піддаються впливу чадного газу CO, є курці, які поглинають більше CO з тютюнових продуктів, ніж з міської атмосфери. Із сигаретним димом курці вдихають чадний газ з концентраціями

близько 400 млн^{-1} , і у них реєструються підвищені рівні карбоксигемоглобіну. Середній рівень HbCO у помірних курців складає 5% [16,17]. Діапазон рівнів HbCO, що спостерігається у запеклих курців, може перевищувати 10% і іноді досягати 15%.

1.4. Всмоктування і метаболізм CO

Відомо, що 1 г гемоглобіну може зв'язувати 1,33-1,34 мл кисню або монооксиду вуглецю, при цьому спорідненість гемоглобіну до монооксиду вуглецю в 200-250 разів більше, ніж до кисню. Якщо для повного насичення гемоглобіну киснем необхідний парціальний тиск порядку 90-100 ммрт.ст., то для чадного газу всього 0,45 ммрт.ст. Це приводить до того, що в конкуренції за гемоглобін монооксид вуглецю має перевагу перед киснем. Швидкість утворення карбоксигемоглобіну прямо залежить від парціального тиску CO у вдихуваному повітрі. Однак через велику спорідненість гемоглобіну до монооксиду вуглецю навіть при порівняно невеликому його вмісті в повітрі утворення карбоксигемоглобіну відрізняється високою інтенсивністю. Швидкому нагромадженню карбоксигемоглобіну в крові сприяє також те, що його дисоціація відбувається в 3600 разів повільніше, ніж дисоціація оксигемоглобіну.

Найпростіша формула інтенсивності поглинання кров'ю монооксиду вуглецю:

$$\% \text{HbCO} = (P_{\text{CO}} \times t \times V_m) \times 0,05$$

де P_{CO} – парціальний тиск CO у мм рт.ст.; t – час експозиції в хвилини; V_m – хвилиний об'єм дихання (у літрах) при нормальних умовах (температура, вологість, атмосферний тиск).

Швидкість поглинання монооксиду вуглецю обернено пропорційна парціальному тиску кисню в повітрі; загальна величина барометричного тиску не грає істотної ролі. Стабільність комплексу карбоксигемоглобіну визначається цілим рядом факторів, з яких найбільше значення має концентрація чадного газу і кисню у повітрі, що вдихається, а також величина парціального тиску кисню і вуглекислого газу крові.

Білком, який швидше всього придушується при значимих рівнях НbCO, є міоглобін, що міститься у великих кількостях в скелетних м'язах і міокарді, що виявляється в порушенні його функції переносу кисню і транспорту кисню з крові в мітохондрії. CO зв'язується також з цитохромоксидазою, кінцевим ферментом у ланцюзі електронного переносу мітохондрій, що є каталізатором відновлення молекулярного кисню до води, придушуючи клітинне дихання і приводячи до анаеробного метаболізму і молочнокислого ацидозу [18].

В організмі ендogenous CO утворюється в результаті ферментативно-керованого катаболізму (розкладання) гем-вміщуючих сполук [19,20]. Основна його продукція обумовлена гемолізом еритроцитарного гема і міоглобіну в ході еритропоезу, спрямованого на усунення старіючих клітин крові. 90% ендogenous CO є продуктом метаболізму альфа-метано вуглецевого атома в протопорфіриновому кільці за участю гемоксигенази під час катаболізму Нb [21].

Крім того, деяка частка ендogenous CO утворюється при деградації цитохромів і ряду металмістких ферментів, таких як каталаза, пероксидаза, триптофанпіролаза, гуанілатциклаза, NO-синтаза та інших. Також можливе утворення відносно малої кількості CO негемової природи за рахунок перекисного окислення ліпідів, фотоокислення, а також активності ксенобіотиків і деяких бактерій [19]. Результати біохімічних досліджень показують, що CO в організмі є не тільки кінцевим продуктом метаболічних перетворень згаданих вище сполук, але і сигнальною молекулою (так званим вторинним месенджером), що бере участь у механізмі перетворення сигналів, регуляції клітинного метаболізму та у передачі інформації [22].

Внутрішнє вироблення CO приводить до базового рівню НbCO 0,4-0,96% у здорової людини, що не зазнала зовнішнього впливу, в стані спокою. У вагітних жінок виробляється приблизно вдвічі більше ендogenous CO. Рівень НbCO у середньостатистичної дорослої людини в умовах легкої фізичної роботи й атмосферного вмісту 35 млн^{-1} CO складає 0,5% [23].

1.5. Виведення СО з організму

Оксид вуглецю не є накопичуваною отруйною речовиною, оскільки молекула НbСО повністю дисоціює, після припинення впливу чадного газу Нb перетворюється в оксигемоглобін, і СО поступово виводиться через легені. У виведенні СО з організму задіяний, насамперед, механізм зв'язування його білковими структурами, що містять гем, (гемоглобін, міоглобін, цитоглобін, нейроглобін, цитохром a_3), короткочасного буферування на них і транспорту по градієнту концентрацій O_2 – від клітин і тканин у легені [24, 25]. Для виведення СО використовується той же ланцюжок механізмів, за допомогою якого здійснюється транспорт кисню з легень і забезпечення дихання клітин, що тільки діє в зворотному напрямку. У клітинах СО може бути зв'язаний цитоглобіном, нейроглобіном або цитохромами a_3 (у мітохондріях клітин). У тканинах СО накопичується на міоглобіні, а в крові – на гемоглобіні. За рахунок потоку кисню, що проникає з кров'ю в тканини і клітини, між цими системами буферування СО відбувається постійний обмін, так що молекули СО поступово просуваються в напрямку від клітин до легень. У легенях СО дифундує з крові в повітряний простір легень і потім за рахунок вентиляції при диханні виводиться в атмосферу. На заключному етапі перебування СО у крові, тобто в альвеолярних капілярах, темп його виділення в повітряний простір легень знаходиться в безпосередній залежності від перфузії й ефективності доставки кисню до альвеолярної мембрани легень [19]. Ця ефективність може мінятися за рахунок варіації як газодинамічних, так і дифузійних характеристик використовуваних дихальних сумішей.

За нормальних умов при свіжому повітрі період напіввиведення СО з крові у дорослих із сидячим способом життя складає близько 5 годин, і виведення сповільнюється в міру зменшення концентрації. Лише невелика частина СО перетворюється при метаболізмі на вуглекислий газ. Застосування кисневої маски може скоротити час напіввиведення до 40-90 хвилин. Гіпербарична дія чистим киснем у барокамері з тиском 3 атм. може зменшити цей час до 20-30 хвилин.

Головним механізмом токсичної дії при дії низького рівня CO є зниження здатності крові до переносу кисню з наступним вивільненням кисню в тканинах, викликане зв'язуванням CO з Hb з утворенням HbCO. Це викликає гіпоксію тканин у різних органах, що мають особливо високу потребу в кисні, таких як серце і мозок. Ознаки і симптоми отруєння CO з'являються при перевищенні концентрації HbCO 10%. Незважаючи на те, що клінічне отруєння не має місця в результаті дії концентрацій CO у зовнішньому середовищі, такі впливи (рівні CO від 50 до 100 млн^{-1} – звичайне явище на автострадах з інтенсивним рухом) достатні для створення концентрацій HbCO 2-6% і несприятливих наслідків для здоров'я у чутливих, некурящих, здорових індивідуумів і груп людей підвищеного ризику.

1.6. Наслідки для здоров'я

Вісім годин дії CO з концентрацією 10 млн^{-1} приводять до утворення 2% HbCO. На цій підставі в США у 1988 р. була встановлена як стандарт припустима середня 8-годинна концентрація CO 10 млн^{-1} . Незважаючи на це, на ділянках з інтенсивним дорожнім рухом концентрація CO може перевищувати стандарт для навколишнього середовища, досягаючи рівнів 50 млн^{-1} і вище. Концентрації HbCO від 2 до 6% знижують анаеробний поріг, і анаеробний метаболізм виникає раніше, викликаючи ранню втому кістякових м'язів і знижуючи максимально стерпне навантаження [26]. Несприятливі наслідки для здоров'я, зумовлені впливом CO із зовнішнього середовища, зв'язані з концентрацією HbCO у крові (табл.1.1). Спостережувані наслідки для здоров'я включають прискорений розвиток серцево-судинних захворювань, психомоторні порушення, знижену працездатність у молодих здорових людей, збільшення щоденної смертності.

Таблиця 1.1. Рівні карбоксигемоглобіну, що виникають в результаті постійного впливу підвищених концентрацій СО у навколишній атмосфері [27].

СО в атмосфері (частинки/млн)	НЬСО в крові (%)	Ознаки та симптоми
10	2	Відсутні
35	5	Відсутність явних симптомів
70	10	Відсутність помітних ефектів, крім задишки при інтенсивному навантаженні; можливі важкість, напруга в чолі; розширення судин шкіри (паління дає 3–10% НЬСО)
120	20	Задишка при помірному навантаженні; періодичні головні болі з пульсацією в скронях
220	30	Виражений головний біль; дратівливість; втома; нудота; затьмарення розуму; можливе запаморочення; нечіткість зору
350 - 520	40 – 50	Головний біль; плутаність думок; прострація; нудота; блювання; колапс; прискорені дихання та пульс; ядуха; неприємність при навантаженні
800 - 1220	60 – 70	Неприємність; кома; конвульсії; слабкі дихання та пульс; респіраторна недостатність, смерть при тривалому впливі
1950	80	Смерть на протязі години

Можна виділити наступні клінічні форми [28, 29]: а) летальна – пацієнт помирає протягом кількох хвилин, надихавшись повітрям з дуже високою концентрацією СО; б) важка (коматозна) форма – пацієнт знаходиться в комі, часто з патологічними рефlekсами, хрипким подихом, червоним обличчям і шиєю; ЕКГ показує гіпоксичні або характерні для інфаркту зміни; венозна кров яскраво-червоного кольору; в) середньої тяжкості – пацієнт якийсь час перебуває в стані розладу свідомості, сопора, з якого порівняно швидко виводиться; спостерігаються головні болі, запаморочення, блювота; г) м'яка форма – виявляється карбоксидна енцефалопатія, що характеризується головним болем, блідістю шкіри, ністагмом, нудотою, блювотою, млістю і слабкістю. Лабораторні тести показують підвищені рівні карбоксигемоглобіну негайно після отруєння, електрокардіографія багатьох пацієнтів з різними

ступенями отруєння показує деполаризаційні зміни у важкій формі, подібні інфарктним.

1.7. Визначення статусу оксигенації крові

Сьогодні в світовій практиці використовуються три методи визначення статусу оксигенації крові (табл.1.2). Вони часто застосовуються взаємозамінно неспеціалістами з лабораторного аналізу, які вважають, що ці методи дають еквівалентні результати, оскільки при відсутності дисгемоглобінів (dysHb), значення, що отримуються всіма трьома, практично ідентичні.

Таблиця 1.2. Три метода визначення статусу оксигенації крові [12].

Прилад:	Газовий аналізатор артеріальної крові	Пульсоксиметр	СО-оксиметр
Зразок:	Кров	Черезшкірно	Кров
Вимірюється:	Парціальний тиск кисню в крові	Поглинання на двох довжинах хвиль (660 і 940 нм) у пульсуючій крові	Поглинання похідних Hb на багатьох довжинах хвиль
Визначається:	P_{O_2} і SO_2 (O_2sat)	SO_2	SO_2 , FO_2Hb , $FHHb$, $FMetHb$, $FSHb$, $ctHb$
Переваги:	Одночасно вимірює рН і P_{CO_2}	Неінвазивний, неперервний приліжковий моніторинг	Вимірювання концентрацій різних форм Hb
Недоліки:	Інвазивний, обчислена SO_2 неточна у пацієнтів з наявністю dysHb	Неточний в присутності перешкод: MetHb, HbCO, SHb, барвників	Інвазивний, виконується в лабораторії, не всі прилади визначають SHb і загальний білірубін
Примітки:	Якщо дані розбіжні з пульсоксиметрією, можлива присутність аномального Hb	При MetHb > 25% пульсоксиметр показує сатурацію 75–85%	Найбільш точний метод, навіть у випадках отруєння CO і метгемоглобінемії. Може мати похибку у випадках HbM

Примітка: HHb – деоксигемоглобін

У випадках зростаючого вмісту карбоксигемоглобіну (HbCO) або метгемоглобіну (MetHb) клінічну важливість має співставлення сатурації киснем і фракційного гемоглобіну. Американським Національним комітетом із стандартів клінічних лабораторій установлені чіткі визначення трьох термінів: сатурації (функціональної) SO_2 , фракційної сатурації FO_2Hb і оцінюваної сатурації киснем (O_2sat) [30]. Сатурація обчислюється з вимірюваних параметрів відповідно до наступних рівнянь:

концентрація загального гемоглобіну

$$tHb = cO_2Hb + cHHb + cMetHb + cHbCO + cSHb;$$

сатурація гемоглобіну киснем

$$SO_2 = \frac{cO_2Hb}{cO_2Hb + cHHb}.$$

Сатурація гемоглобіну киснем може бути виміряна за допомогою пульсоксиметрії (найбільш часто позначається як SaO_2 або SpO_2) або СО-оксиметрії. Незалежно від методу, що використовується, сатурація киснем є мірою частини оксигенованого гемоглобіну по відношенню до кількості гемоглобіну, який має здатність переносити O_2 : фракційний оксигемоглобін

$$FO_2Hb = \frac{cO_2Hb}{ctHb} \times 100\%$$

Фракційний гемоглобін може бути виміряний лише багатохвильовим спектрофотометром, таким як СО-оксиметр. FO_2Hb є часткою оксигемоглобіну по відношенню до загального гемоглобіну (включаючи форми гемоглобіну, які не зв'язують кисень). Доля будь-якої похідної гемоглобіну може бути обчислена аналогічним чином. У здорових людей SaO_2 і FO_2Hb приблизно рівні. В присутності значної кількості фракцій дисгемоглобіну значення FO_2Hb будуть значно нижче, ніж сатурація, яка визначається пульсоксиметрією. Останній підхід до визначення сатурації киснем – оцінювана сатурація киснем (O_2sat), яка обчислюється газовими аналізаторами крові з значень pH , P_{O_2} та гемоглобіну з використанням емпіричних рівнянь [31].

2. МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Спектрофотометричні методи аналізу форм гемоглобіну

Молекули гемоглобіну легко можуть бути виявлені спектрофотометричними методами. Змінена молекулярна структура елемента гему в різних дериватах гемоглобіну створює унікальні спектри поглинання. Характерні спектри поглинання дають можливість визначити концентрацію кожної похідної гемоглобіну, яка є в суміші.

Спектрофотометричні методи аналізу базуються на пропорційності поглинання світла концентрації розчину. Поглинання являється адитивною величиною, і для отримання концентрацій n складових потрібно виміряти поглинання мінімум на n довжинах хвиль. Пульсоксиметрія є найбільш простим спектрофотометричним методом, який використовує дві довжини хвилі (як правило, 660 та 940 нм) і вимірює вміст двох форм гемоглобіну, HbO_2 и Hb . Існують більш складні фотометри (СО-оксиметри), які вимірюють поглинання на чотирьох, шести і більшій кількості довжин хвиль і які визначають вміст ctHb и SaO_2 , а також FHb , FO_2Hb , FHbCO , FHbF , FMetHb , FSHb . Як правило, довжини хвиль обирають серед максимумів поглинання та ізобестичних точок компонент, які потрібно виміряти. Деякі сучасні моделі СО-оксиметрів проводять вимірювання на 128 довжинах хвиль і мають назву неперервно-хвильових спектрофотометрів. Додаткові довжини хвиль надають можливість мінімізувати вплив речовин, які створюють завади за рахунок накладання спектрів та отримати дані про інші складові. Слід зазначити, що, на відміну від пульсоксиметрів, СО-оксиметри для аналізу потребують забору крові у пацієнтів.

SaO_2 , вимірювана пульсоксиметром, може бути клінічно оманливою в присутності таких дисгемоглобінів як HbCO та MetHb , оскільки значення SaO_2 з пульсоксиметра будуть близькими до нормальних навіть при рівнях HbCO або $\text{MetHb} > 50\%$. Наприклад, в дослідженні [32], яке проведено на собаках з вентиляцією чадним газом, показано, що значення SaO_2 , яке було виміряне пульсоксиметрією, явно відрізняється від FO_2Hb , що було виміряне СО-

оксиметрією, при зростанні рівня HbCO . HbO_2 спадає лінійно з підвищенням HbCO по мірі того, як CO заміщує O_2 в залізі гему. Важливо відмітити, що при летальній концентрації 70% HbCO пульсоксиметрія дає сатурацію 90%, в той час як покази FO_2Hb CO -оксиметра падають до 30%, що більш вірно відображає зменшення вмісту кисню. У випадку дії чадного газу на людей різниця між SaO_2 , яка виміряна пульсоксиметром, та виміряним FO_2Hb , обмежена вимірювальним “зазором” пульсоксиметра і у здорових індивідуумів складає зазвичай 3–5% [33]. Цей пульсоксиметричний “зазор” і визначається різницею між SaO_2 (SpO_2), яка вимірюється пульсоксиметром, і HbO_2 , яка вимірюється CO -оксиметром.

Існує ряд робіт, які присвячені точності визначення HbCO , в яких показано, що CO -оксиметри суттєво завищують концентрацію HbCO при рівнях $<5\%$, тобто в діапазоні, важливому для багатьох клінічних застосувань, пов'язаних, зокрема з оцінкою впливу на здоров'я оточуючого середовища, вивченням гемолізу у новонароджених та дорослих тощо [34-35].

Взагалі кажучи, найбільш точним і чутливим методом виміру вмісту карбоксигемоглобіну в крові є газова хроматографія (поріг виявлення HbCO – 0,005%), яка вважається еталонним методом для аналізу HbCO [36], оскільки, на відміну від спектрофотометрії, є високоспецифічною до монооксиду вуглецю CO і не піддається впливу речовин, що створюють перешкоди за рахунок накладення спектрів. Однак, застосування газової хроматографії обмежене дослідницькими лабораторіями через її складність, витрати часу і необхідність залучення кваліфікованого персоналу.

В роботі [37] оцінювалася точність визначення концентрації загального гемоглобіну і карбоксигемоглобіну у зразках крові пацієнтів 5-ма спеціалізованими промисловими спектрофотометрами (табл.2.1) – IL 482 CO -Oximeter, Corning 2500 CO -oximeter, Radiometer OSM 3 Hemoximeter, Corning 270 CO -oximeter, та AVL 912 CO -Oxylite – у порівнянні з ручним ціанметгемоглобіновим методом і газовою хроматографією. Для вимірювань StHb відмінності між ціанметгемоглобіновим методом і даними CO -оксиметрів

були клінічно несуттєвими для кожної з моделей. При вимірюваннях НbCO крові напрямок зсуву показів у порівнянні з газовою хроматографією залежав від концентрації НbCO. Загалом, CO-оксиметри занижували концентрацію НbCO при рівнях >2,5% від загального гемоглобіну і завищували її при рівнях, менших або рівних 2,5%. Неточність CO-оксиметрів при низьких рівнях НbCO ($\leq 2,5\%$) у ряді ситуацій робить ці прилади малозастосовними.

Прилад	Довжина хвиль вимірювання, нм	Об'єм зразка, мкл нормальний/мікро
IL 482 CO-oximeter	535,0; 585,2; 594,5; 626,6	175/85
CCD 2500 CO-oximeter	521; 535; 546; 585; 594; 627; 660	200/85
OSM 3 Hemoximeter	535; 560; 577; 622; 636; 670	35/35
CCD 270 CO-oximeter	557; 577; 597; 605; 624; 635; 650	100/35
AVL 912 CO-Oxylite	530; 536; 542; 548; 554; 560; 566; 572; 578; 584; 590; 604; 612; 622; 630; 640; 648	100/40

Таблиця 2.1 CO-оксиметри та їх основні характеристики

З іншого боку, відомо, що багато речовин вносять похибку при вимірюванні НbCO CO-оксиметрами. Ембріональний гемоглобін, температура, білірубін створюють перешкоди при спектрофотометричному визначенні НbCO, якщо присутні в достатніх кількостях [38, 39]. Барвник метиленовий синій (при 25 мг/л) і сульфгемоглобін (при 10%) також негативно впливають на точність вимірів. Метгемоглобін і оксигемоглобін також можуть вносити погрішність в усі результати багатокомпонентного CO-оксиметричного аналізу. Іони металів і органічні сполуки, що негативно впливають на вимірювання НbCO ІЧ-спектрофотометрією [40], також можуть впливати й у видимій області спектра. Також є публікації про вплив рН на точність спектрофотометричних вимірювань НbCO.

Оскільки переважна більшість вимірювань концентрації карбоксигемоглобіну проводиться на зразках крові, взятих у пацієнтів, тобто інвазивними методами, що не завжди зручно і безпечно, великий інтерес являє

розвиток оптичних методик, що забезпечують неінвазивне визначення змісту HbCO у крові. У роботі [41] було зроблено спробу визначення карбоксигемоглобіну в крові по спектрах відбиття від поверхневих тканин людини. Експеримент проводився на пацієнті, який певний час утримувався від паління, і після паління. Дані збиралися на одній довжині хвилі – 550 нм, за припущенням, найбільш чуттєвої до зсуву смуги поглинання гемоглобіну при перетворенні в карбоксигемоглобін. На даній довжині хвилі відбиття мінялося від 28,9% до паління до 31,3% після паління. Для доведення описаної методики до практичного застосування необхідні дослідження для отримання калібрувальних даних.

2.2 Методи виміру карбоксигемоглобіну в крові.

Всі доступні до недавнього часу засоби вимірювання вмісту карбоксигемоглобіну в крові малопридатні для підтвердження діагнозу отруєння CO у невеликих лікарнях і, тим більше, в польових умовах або на місці події. Рятувальним, пожежним службам і швидкій допомозі для своєчасної констатації отруєння і вжиття відповідних заходів важливо мати на озброєнні компактний прилад для швидкого неінвазивного вимірювання концентрації карбоксигемоглобіну в крові типу пульсоксиметра.

Перші пульсові CO-оксиметри з'явилися порівняно недавно, на сьогоднішній день відомі: портативний пульсовий CO-оксиметр Rad-57 (MasimoCorporation, США) [42] і розробка пульсоксиметра, який вимірює HbCO, японської NihonKohdenCorporation [43].

У Rad-57 використаний багатохвильовий датчик на світлодіодах (довжини хвиль і їх кількість, які реалізовані в приладі, автори не вказують) і реалізований алгоритм обробки сигналу MasimoRainbow SET. Дослідження точності вимірювань концентрацій карбоксигемоглобіну, виконані на 160 добровольцях, включаючи запеклих курців, шляхом порівняння з аналізом зразків крові на аналізаторі ABL-700 з CO-оксиметрією, показало, що в діапазоні концентрацій HbCO від 0 до 40% точність вимірювань складає 2,8% при коефіцієнті кореляції 0,97.

В пульсоксиметрі Nihon використовується пальцевий датчик із трьома довжинами хвиль (які саме, не вказано). Експерименти на добровольцях із вдиханням повітряної суміші, що містить CO, показали досить високу кореляцію показів пульсоксиметра (SpCO) з даними CO-оксиметрії (SaCO) ($r = 0,92$; $P < 0,001$).

Серед неінвазивних пристроїв для визначення карбоксигемоглобіну в крові відомі також аналізатори CO у видихуваному повітрі, наприклад, Micro CO компанії MicroMedical (США) [44]. Принцип дії пристрою – електрохімічний, оснований на реакції монооксиду вуглецю у складі видихуваного повітря з електролітом одного електроду датчика, а кисню видихуваного повітря з іншим. Реакція викликає електричний потенціал, пропорційний рівню концентрації CO. Отримані дані обробляються мікропроцесором, і потім пікова концентрація чадного газу відображується на дисплеї в ppm (частинках на мільйон) або за допомогою вшитої програми переводиться в %HbCO. Пристрій Micro CO використовується для моніторингу вмісту CO в альвеолярному повітрі для діагностики отруєння чадним газом, а також в антитютюнових програмах з метою сприяння відмовленню від паління (контроль динаміки стану, демонстрація небезпеки паління й ефективності здорового способу життя).

2.3. Метод фотодисоціація комплексів гемоглобіну

Про фотоліз комплексів гемопротеїнів відомо більше 100 років, з того часу коли був виявлений розпад карбоксигемоглобіну у зразках крові під дією денного світла. Через 60 років до переліку гемопротеїнів, що зазнають фотодисоціації, був внесений оксигемоглобін та ряд інших сполук. Фотохімія гемопротеїнів вивчалась в основному методами оптичної та ІЧ спектроскопії. З появою імпульсної лазерної спектроскопії та вдосконаленням спектроскопічної техніки почались спроби виміряти квантові виходи фотодисоціації різних комплексів гемоглобіну. У перших дослідженнях були отримані досить низькі значення квантового виходу, на рівні 0,01 для оксигемоглобіну HbO_2 , і 0,4 для карбоксигемоглобіну HbCO [45]. По мірі розвитку методу флеш-фотолізу і

скорочення тривалості лазерного імпульсу, одержували більш високі значення квантового виходу; так у роботі [46] отримані значення 0,08 для HbO_2 і 0,7 для HbCO . У роботі [47] отримані значення квантового виходу 0,65 для HbO_2 при опроміненні пікосекундними і 0,8 для HbCO при опроміненні наносекундними імпульсами. Малі значення, отримані в попередніх роботах при більшій тривалості імпульсів опромінення, стали пояснювати швидкими процесами парної рекомбінації кисню з гемом. Під парною, або внутрішньою, рекомбінацією розуміють повторне зв'язування ліганду, що знаходиться всередині молекули білка, з атомом заліза гему, на відміну від повторного зв'язування з гемом молекули ліганду, що вийшла у розчин. У більш пізній роботі [48] було отримано значення квантового виходу оксиміоглобіну MbO_2 0,28 на шкалі в декілька пікосекунд, при використанні карбоксиміоглобіну як еталону з квантовим виходом, рівним одиниці.

Цілий ряд робіт був присвячений дослідженню швидкої кінетики процесів фотодисоціації, парній рекомбінації, електронній релаксації і повторному зв'язуванню [49-51], а також конформаційних переходів комплексів гемоглобіну з лігандами і констант зв'язування [52-55]. Згідно [56], кінетика процесу фотодисоціації оксигемоглобіну та інших комплексів гемопротейну з лігандами може бути представлена у вигляді наступних стадій. При поглинанні фотона спочатку відбувається перехід у збуджений стан з характерним часом $\tau_{1/2} < 50$ фс, незалежно від типу ліганду. Слідом іде фотодисоціація комплексу і поява спектру деоку Hb ($\tau_{1/2} = 300$ фс) з наступною швидкою релаксацією, що відповідає переходу збудженої молекули на основний енергетичний рівень (близько 3 пс), і парною рекомбінацією продуктів фотодисоціації (для HbO_2 від 1 до 3 нс, для HbCO – 100 нс).

У роботі [57] для з'ясування природи власне квантових виходів і парної рекомбінації монооксида вуглецю та кисню з гемоглобіном і міоглобіном використано спектроскопію поглинання з пікосекундним розділенням при криогенних температурах. Знайдено, що виходи продуктів фотодисоціації через 40 пс і більш тривалий час (хвилини) після фотолізу при 8 К схожі; однак, вихід

кисню складає $0,4 \pm 0,1$, а вихід монооксиду вуглецю $1,0 \pm 0,1$ як для міоглобіну, так і для гемоглобіну. Ці результати ставлять під сумнів попередні дослідження кінетики рекомбінації O_2 . Значна субнаносекундна парна рекомбінація спостерігається в оксигемоглобіні до 150 К, тоді як нижче 100 К ця парна рекомбінація зникає. Більш низькі виходи фотопродуктів для оксигемових білкових комплексів відносять за рахунок субнаносекундних і субпікосекундних рекомбінацій, які залежать від динаміки лігандів і білків. Крім парної рекомбінації, за якої молекула кисню повторно асоціює з тим же гемом, не встигнувши віддалитися на достатню відстань, відзначають також більш повільні процеси повторного зв'язування кисню, що вивільнився, на мікросекундній шкалі (11 мкс і 31 мкс для β та α субодиниць Hb^R , відповідно [51]).

За останніми даними (Falahati, 2018 [52]), процес і механізм фотодисоціації комплексу гем-ліганд, на прикладі найбільш вивченої сполуки, карбоксиміоглобіну $MbCO$, можна описати наступним чином.

Поглинання світла запускає фотоліз двохатомного ліганду та спіновий перехід в атомі заліза (II), який ініціює конформаційні зміни білка. Реакції фотолізу та перехресного спінового переходу відбуваються одночасно на фемтосекундній шкалі часу. Мікроскопічне походження цих реакцій залишається суперечливим. Для зв'язування механізму надшвидкого фотохімічного процесу у комплексі гем-СО в роботі [52] застосована квантова динаміка хвильового пакету. Спостерігаються когерентні коливання відстані зв'язку Fe-СО з періодом 42 фс і амплітудою $\sim 1 \text{ \AA}$. Ці рухи ядер викликають виражену геометричну реорганізацію, що робить дисоціацію СО необоротною. У реакції спочатку переважають коливання, що порушують симетрію, та призводять до переносу електрона з порфірину на залізо. Згодом хвильовий пакет послаблюється до триплетного набору впродовж ~ 75 фс і до квінтетного набору впродовж ~ 430 фс. Результати висвітлюють центральну роль ядерних коливань у виникненні надшвидкої фотодинаміки металоорганічних комплексів.

Дисоціація двохатомного ліганду відбувається паралельно зі спіновим переходом від низькоспінового до високоспінового стану центру FeII. Комплекс гем-СО початково знаходиться в синглетному низькоспіновому стані ($S = 0$), який при дисоціації СО перетворюється на високоспіновий квінтет ($S = 2$) [58]. Незв'язаний СО в порожнині міоглобіну разом із рухами залишкового гема ініціює "дрижання білка", що відкриває канал для виходу двохатомної молекули. Фотоліз може бути ініційований після поглинання з переходом на найнижчий збуджений синглетний стан порфірину (1Q) або другий збуджений стан (1B) [59].

Фотоліз гем-СО є надшвидким процесом. Нещодавні рентгеноструктурні дослідження міоглобіну з початковим імпульсом накачування, що збуджує стан 1Q , очевидно, узгоджуються з двоетапною кінетичною реакцією: (i) перший етап тривалістю $<50-70$ фс, пов'язаний як з фотолізом СО, так і з частковим перехресним спіновим переходом, і (ii) завершення переходу до високоспінового стану впродовж $\sim 300-400$ фс [60, 61]. Незважаючи на численні дослідження фотолізу комплексу гем-СО, кінетика та механізм дисоціації все ще носять дискусійний характер, зокрема стосовно надшвидкого характеру реакції, спіну та характеру фотолітичного стану. З експериментальних даних про швидкість фотолізу нічого невідомо, окрім верхньої межі у $50-70$ фс. Що стосується фотолітичного стану, то за найпоширенішою гіпотезою дисоціація пов'язана з переносом заряду метал-ліганд. Вважається, що фотоліз відбувається при переносі заряду з триплетного стану металу на порфіринове кільце. У моделі Franzen та ін. [59] надшвидкісна реакція обумовлена валентною таутомерією (здатністю певних хімічних сполук існувати як суміш двох взаємооборотних ізомерів у рівновазі). Цей механізм передбачає швидке взаємне перетворення декількох квазівироджених електронних станів, що включають d-переходи, деякі з котрих є дисоціативними для зв'язку СО. Тим не менш, експерименти та теорія не дають єдиної картини на сьогоднішній день. Недавні теоретичні дослідження подібних залізовмісних комплексів вказують

на фундаментальну роль ядерних рухів у поясненні надшвидкого характеру міжсистемного переходу.

В роботі [52] досліджували механізм надшвидкого фотолізу гем-СО за допомогою квантової динаміки хвильового пакету, що відповідає за когерентний рух ядер та електронів [62]. Виявлено, що фотоліз СО відбувається приблизно впродовж 20 фс у стані $^1\text{MLCT}$ (metal-ligand charge transfer – перенос заряду метал-ліганд) перед спіновим переходом. Надшвидка природа фотолізу обумовлена сильною електронно-коливальною взаємодією та смугою квазінеперервних станів. Після дисоціації процес спінового переходу ініціює послідовний перехід гему спочатку в триплет $^3\text{MLCT}$, а потім у високоспіновий квінтет $^5\text{MLCT}$.

Походження зв'язку гем-СО є типовим механізмом σ -донації та зворотної π -донації. Частковий перенос електрона з зайнятої σ орбіталі СО на порожню орбіталь $d_z^2\text{Fe}$ відбувається одночасно з частковим зворотним перенесенням електронної густини з зайнятих орбіталей d_{yz} і $d_{xz}\text{Fe}$ на порожні $\pi_{y^*,\text{CO}}$ і $\pi_{x^*,\text{CO}}$ орбіталі СО, відповідно. У цій геометрії π -орбітали порфірину не перекриваються з d -орбіталами. Різні типи коливань можуть послаблювати зв'язок гем-СО, тим самим звільняючи двоатомну молекулу. Найважливішим є дисоціативне координатне коливання, яке відповідає симетричному розтягуванню $\text{Fe}-\text{CO}$. Це головна координата реакції фотолізу СО. Розтягування $\text{Fe}-\text{CO}$ зменшує перекриття орбіталей заліза та СО, що зменшує як силу σ -донації, так і зворотної π -донації. Після того, як СО вивільняється, решта комплексу стабілізується у квінтетному стані. Це виводить Fe -центр з площини кільця, що стабілізується π -взаємодіями з антизв'язуючими орбіталами порфірину.

На рис. 2.1 показана динаміка фотолізу та спінового переходу комплексу гем-СО, з початковими умовами, усередненими за понад 10 знімками молекулярної динаміки. На рис.2.1a відображена еволюція діабатичних популяцій для станів ^1Q , $^1\text{MLCT}$, триплету $^3\text{MLCT}$ і квінтету $^5\text{MLCT}$. На першому етапі заселеність ^1Q швидко зменшується, даючи підйом заселенню

¹MLCT впродовж 75 фс. Під час інших етапів переходу співіснують три спінові різноманіття, тому що вони близькі за енергією і сильно змішуються через спин-орбітальну взаємодію. Після першого етапу зростає заселення триплету; заселення квінтету наростає повільніше, і розвивається до домінуючого стану близько 350 фс. На рис.2.1b схематично подані механізм реакції та інтерпретація в термінах проміжків часу. При початковому збудженні до Q-смуги стан переносу заряду метал-ліганд (MLCT) заселюється впродовж ~25 фс. На другому етапі система релаксує до триплету (~75 фс) і до найнижчого квінтету (~430 фс). Чорні стрілки вказують на напрям перенесення електронів і основні ядерні рухи.

Рис.2.1с показує еволюцію відстані Fe-C(O) та відстань Fe від площини кільця. Спостерігаються великі амплітудні рухи з періодом коливання 42 фс. Амплітуда коливань спочатку складає 0,9 Å і сходиться до значення 2,2 Å. На цій відстані CO по суті фотолізований. Стандартне відхилення цих геометричних значень відображено як затінена область. У вставці показано Фур'є перетворення Fe-C(O) коливань у хвильові числа в см⁻¹.

Очевидно, щоспостерігається затухання розтяжних коливань із значною амплітудою для відстані Fe-C, яке сходиться до сталого значення 2,2 Å. Ці рухи когерентні, з періодом 42 фс. Фур'є-перетворення цього сигналу показує частоту 800 см⁻¹, набагато більшу, ніж частота розтяжних коливань Fe-C(O) 488 см⁻¹. Впродовж 21 фс відстань Fe-CO коливається між рівноважною відстанню (1,7-1,8 Å) і 2,5 Å. Це типові відстані, при яких відбувається дисоціація основного стану. Після першого коливання хвильовий пакет, по суті, знаходиться в смугах MLCT, які є відштовхуючими для CO, так, що CO не рекомбінує і зазнає постійних коливань. Релаксація структури гасить ці коливання до досягнення рівноважного значення 2,2 Å. Що ж стосується еволюції руху атому Fe поза площиною кільця, то спостерігаються коливання ± 0,2 Å навколо початкового положення, що добре узгоджується з останніми даними рентгенівської кристалографії [63]. Очікувано, центр заліза реагує на подовження відстані Fe-CO, слідуючи за CO. Дуже швидко він коливається

назад до площини порфірину, де частина енергії розсіюється на гістидин. У другому та наступних осциляціях коливання Fe та CO виходять з фази, що свідчить про те, що зв'язок фотолізується. Таким чином, дисоціація відбувається між 0,5 і 1,5 періодами коливання Fe-C(O) (20-60 фс), коли хвильовий пакет переважно знаходиться в стані $^1\text{MLCT}$.

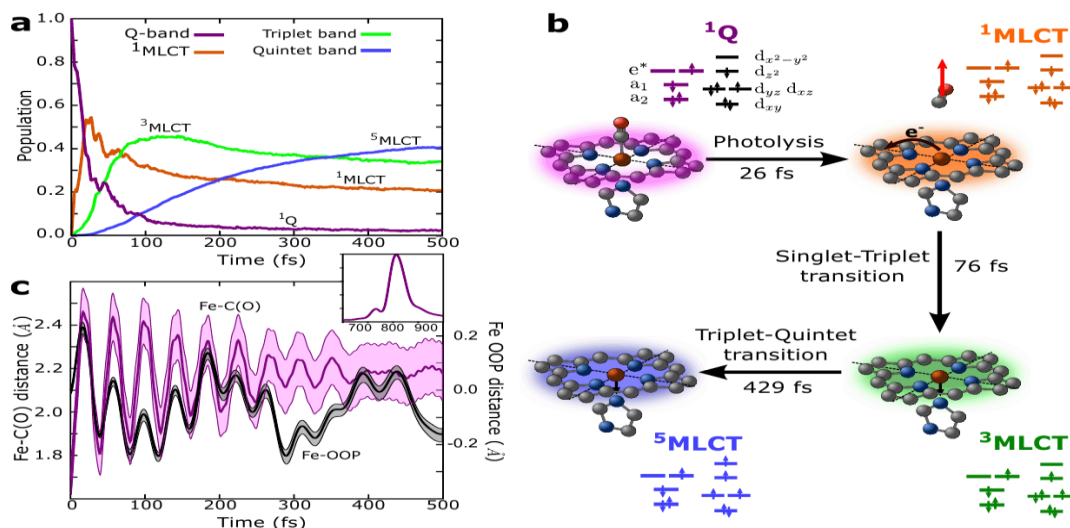


Рис. 2.1. Квантова фотодинаміка гем-СО-комплексу протягом перших 0,5 пс. (а) Еволюція діабатичних популяцій для станів ^1Q , $^1\text{MLCT}$, $^3\text{MLCT}$ і $^5\text{MLCT}$. (б) Схема реакції та інтерпретація в термінах проміжків часу. (с) Еволюція відстані Fe-C(O) та відстані Fe від площини кільця. У вставці показано Фур'є перетворення коливань Fe-C(O) у cm^{-1} [52].

Після швидкої фотодисоціації ліганд певний час знаходиться всередині молекули білка. З використанням рентгеноструктурного аналізу, спектроскопії з розділенням у часі і комп'ютерного моделювання молекулярної динаміки було встановлено, що існує п'ять станів білка: стан А, в якому ліганд зв'язаний з атомом заліза, стан В, в якому ліганд знаходиться в кишені гему, стан S, в якому дисоційований ліганд вийшов у розчин, а також два додаткові стани С і D, в яких ліганд може перебувати всередині білка (рис.2.2). У випадку MbCO, впродовж пікосекунд після фотодисоціації ліганди СО переміщуються з місця їх зв'язування А в протестичній групі гему міоглобіну до першого так званого док-сайту (місця утримання) В в дистальній кишені гему. Спектроскопічно та кінетично розрізняються дві траєкторії з константами часу $0,20 \pm 0,05$ пс і $0,52 \pm 0,10$ пс, що призводять до розташування СО в межах док-сайту з

протилежними орієнтаціями. Білок реорганізується навколо захопленого CO з константою часу $1,6 \pm 0,3$ пс і швидко встановлює енергетичний бар'єр, який завадить процесу зворотного приєднання.

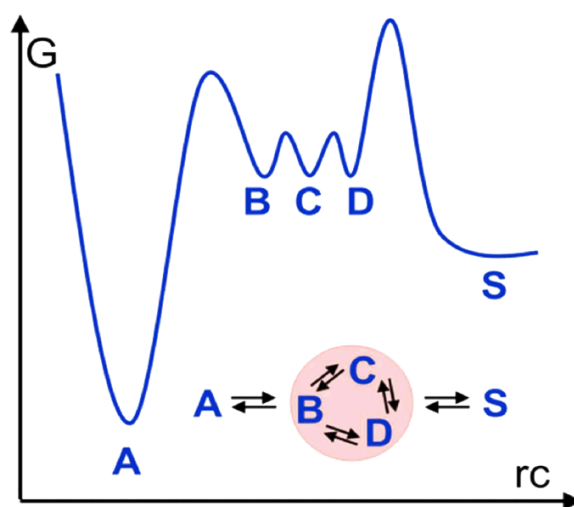


Рис. 2.2. Профіль вільної енергії G реакції, що описує зв'язування ліганду в Mb. Флеш-фотолізна кінетика рекомбінації CO при 436 нм і 20°C; rc – координата реакції [64].

Таким чином, окрім місця зв'язування ліганду в залізі гему, в гемовій кишені існує первинний док-сайт утримання лігандів, що забезпечує ефективне зв'язування ліганду з гемовим залізом та вивільнення його. Крім того, існують вторинні док-сайти приєднання лігандів, які приписуються так званим ксеноновим порожнинам Xe4 та Xe1 (вперше виявленим як місця зв'язування атомів Xe в експериментах з кристалічним MbCO в атмосфері ксенону), що проявляються у кінетичних станах C і D в кінетиці рекомбінації. Додаткові док-сайти сильно впливають на процес зв'язування ліганду, хоча їх фізіологічна значимість на даний момент не є повністю зрозумілою.

Після дисоціації з атомом заліза гему молекули ліганду або рекомбінують всередині з дистальної кишені (DP) або вивільняються в розчин. Виходу ліганду сприяють теплові флуктуації, які короткочасно відкривають вихідні канали. У роботі [65] неперервне опромінення нативних кристалів MbCO імпульсним лазером при криогенних температурах показало, що міграція ліганду CO у кожен порожнину викликає структурні зміни амінокислотних залишків навколо порожнини, що призводить до розширення порожнини з

рухом, подібним до дихання. Послідовний рух ліганду та порожнини передбачає механізм саморозкриття міграційного каналу ліганду, що підтверджується комп'ютерним аналізом геометрії методом теселяції Делоне. На рис. 2.3 показано накладені одна на одну кристалічні структури MbCO до і після фотодисоціації CO при 40°K. Кристалографія продуктів фотолізу MbCO виявляє проміжні структури, в яких дисоційована молекула CO захоплена в порожнинах DP, Xe4 і Xe1. При температурах вище склування Mb молекула CO перестрибує між порожнинами; міграція молекули до сайтів Xe4 та Xe1 супроводжується структурною релаксацією білка.

В роботі [64] методом флеш-фотолізу і спектроскопії з розділенням у часі контролювався електронний перехід на смузі Core (~400 нм) простетичної групи гему, чутливий до зв'язування лігандів з залізом гему. В експериментах з флеш-фотолізом часто віддають перевагу CO над фізіологічним лігандом O₂ силу технічних переваг. В присутності O₂ гем піддається автооксидації, що вносить експериментальні проблеми, а CO має додаткові спектроскопічні переваги, включаючи сильне ІЧ поглинання. Більш того, хоча CO та O₂ можуть бути фотодисоційовані із значним квантовим виходом, значна частина лігандів O₂ не може спостерігатися в експериментах флеш-фотолізу на наносекундній шкалі навіть при ~ 4°K, тому що вони рекомбінують практично без бар'єру на пікосекундній шкалі часу. Використання CO спрощує експерименти і, завдяки подібному розміру лігандів, дозволяє аналізувати аналогічні міграційні ефекти з O₂.

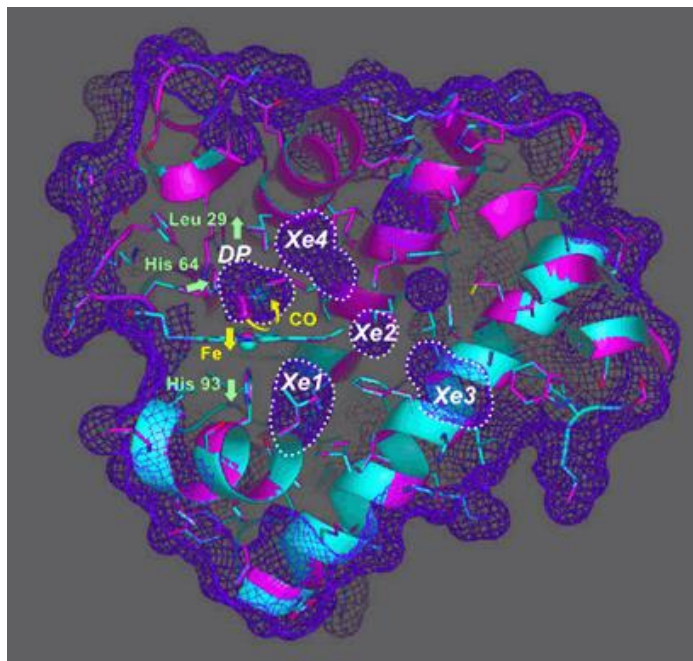


Рис. 2.3. Кристалічні структури MbCO до і після фотодиссоціації CO при 40°K накладені і відображені рожевим та блакитним, відповідно. Поверхні молекули MbCO та внутрішніх порожнин показані фіолетовою сіткою. Внутрішні порожнини (DP, Xe1, Xe2, Xe3 та Xe4) позначені пунктиром. Густина електронів зв'язаних та дисоційованих молекул CO у дистальній кишені DP представлена рожевим та блакитним, відповідно. Стрілками показано рух CO, атома Fe, His-64, Leu-29 і His-93 після фотодиссоціації [65].

Для міоглобіну природного типу частка молекул MbCO, з якої ліганди CO виходять у розчин після фотодиссоціації, становить 96%, а відповідна частка молекул MbO₂ – 47%. У більшості зразків парна рекомбінація Mb з CO триває до ~100 нс, а Mb з O₂ – менше 10 нс. Повторне зв'язування молекул ліганду з розчину для CO відбувається на шкалі ~10 мс, тоді як для кисню проходить на порядок швидше, на шкалі ~1 мс [66].

На відміну від Mb, у димерномукарбоксихемоглобініHb(I)CO після фотолізу CO відбувається конформаційний перехід від R-стану з високою спорідненістю до T-стану з низькою спорідненістю четвертинної структури білка Hb(I). Через перебудову гему стерична взаємодія між боковим ланцюгом гістидину H69 в не зв'язаному з лігандом T-стані та лігандом на підході збільшується, таким чином, парна рекомбінація пригнічується і швидкість повторного зв'язування на порядок нижча.

Більшість відомих з літератури досліджень кінетики процесів фотодисоціації комплексів гемоглобіну з лігандами виконані з використанням джерел випромінювання з довжиною хвилі у ближній УФ області, області смуги Соре (415 нм для HbO_2 , 419 нм для HbCO , 430 нм для Hb), а також β - і α -смуг поглинання (541 і 577 нм для HbO_2 , 540 і 569 нм для HbCO , 555 нм для Hb), оскільки це найбільш сильні смуги поглинання у водних розчинах *invitro*, рідше – у червоній області, і практично відсутні дані досліджень ефекту в ближній ІЧ області спектру. Серед великої кількості експериментальних даних мало інформації про зв'язок ефективності реакції фотодисоціації з довжиною хвилі діючого випромінювання.

Всі відомі роботи з визначення квантового виходу фотодисоціації комплексів гемоглобіну з лігандами виконані на водних розчинах *in vitro* і базуються на дослідженні змін у спектрах поглинання під час опромінення. Першим і найбільш дослідженим комплексом є карбоксигемоглобін, оскільки фотолітичний ефект при його опроміненні найбільш виражений. На рис. 2.4 наведено спектри поглинання деоксигемоглобіну Hb і карбоксигемоглобіну HbCO у ближній УФ і видимій області. Типовим прикладом є робота [67], в якій вимірювалось поглинання HbCO в області 432 нм (смуга Соре) під час опромінення короткими імпульсами (8 нс) лазера з довжиною хвилі 532 нм. Дані по квантовому виходу фотодисоціації карбоксигемоглобіну людської крові, отримані в більш ранніх роботах [46], використовуються у якості референсних значень для визначення квантових виходів інших сполук гемоглобіну.

Відомо також, що квантовий вихід фотодисоціації комплексів гемоглобіну залежить від ряду факторів: температури, білкового оточення та динаміки білків, рН та іонної сили розчину і т.і. [46, 68, 67].

В роботі [46] досліджувався вплив температури на фотодисоціацію, зокрема, оксигемоглобіну та карбоксигемоглобіну у буферних розчинах методом флеш-фотолізу при опроміненні в області смуги Соре. Отриманий квантовий вихід фотодисоціації Φ був більшим при 40°C, ніж при 0°C; в

загальному випадку більше зростання спостерігалось в менш світлочутливих комплексах. Так, співвідношення Φ при 40°C до Φ при 0°C становило 1,8 для HbCO і 2,7 для HbO₂ з вихідними значеннями Φ 0,38 та 0,028 відповідно. В роботі [69] також методом лазерного флеш-фотолізу (імпульси тривалістю 350 нс при довжині хвилі 540 нм) досліджувався квантовий вихід фотодисоціації оксигемоглобіну у буферному розчині в залежності від білкової конфігурації та температури. Відмічено збільшення квантового виходу фотодисоціації з ростом температури; так при високому значенні сатурації (99%) Φ зростав від 0,03 при 0°C до 0,07 при 40°C і при низькій сатурації (15%) від 0,03 до 0,09 відповідно.

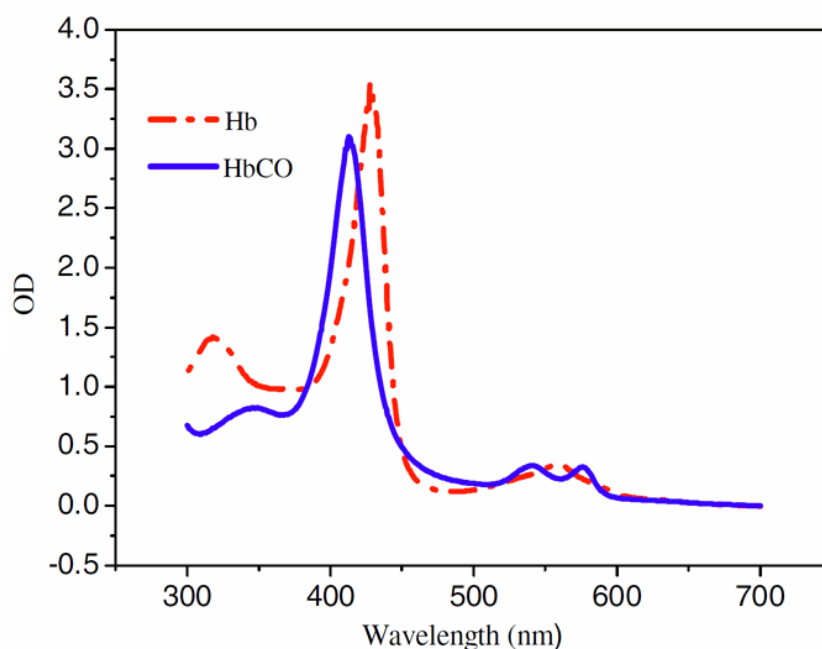


Рис. 2.4. Спектри поглинання гемоглобіну і карбоксигемоглобіну у ближній УФ і видимій області.

При дослідженні залежності ефективності фотодисоціації від температури потрібно враховувати зміни з температурою поглинання окси- та карбоксигемоглобіну. В роботі [39] вивчався вплив температури на спектри поглинання HbO₂ і HbCO у розчинах. При збільшенні температури від 20 до 40°C поглинання в області максимумів смуг HbO₂ і HbCO зменшується на 3–4%, а в області 600 нм збільшується на 1–1,5% (рис.2.5), що повинно приводити до деякого зменшення квантового виходу фотодисоціації в зеленій області спектру і незначного його збільшення у червоній області. На жаль, відсутні дані по впливу температури на відповідні спектри поглинання у ближній ІЧ області.

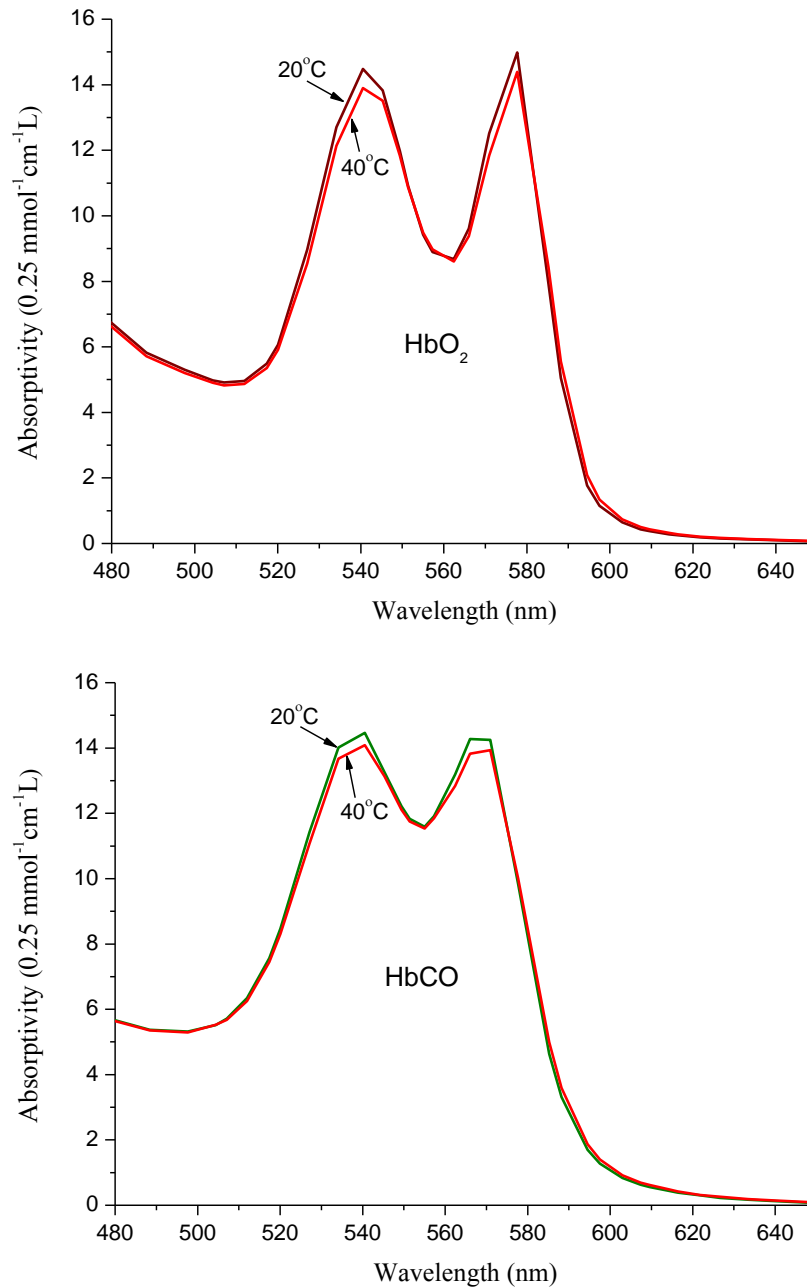


Рис. 2.5. Вплив температури на спектри поглинання у видимій області оксигемоглобіну (зверху) і карбоксигемоглобіну (знизу) у розчинах [39].

Природно очікувати, що ефекти у нативних умовах *in vivo* будуть відрізнятися від результатів досліджень фотодисоціації комплексів гемоглобіну, отриманих у буферних розчинах, з огляду на інше біологічне середовище та особливості поширення світла в тканині. Крім того, як вже зазначалось, бракує експериментальних даних про ефективність фотодисоціації оксигемоглобіну і карбоксигемоглобіну і її залежність від температури під дією випромінювання у червоній і, особливо, у ближній інфрачервоній області

спектру, які б забезпечили інформацію про можливості примусового вивільнення кисню і СО у біологічній тканині та їх використання у терапії різних захворювань та детоксикації отруєнь чадним газом.

Ці методи дослідження детально вивчені в роботі і пропонуються для подальших експериментальних досліджень детоксикації курців при отруєнні чадним газом шляхом лазерно-стимульованої фотодисоціації карбокси-гемоглобіну в Інституті прикладних проблем фізики та біофізики НАН України.

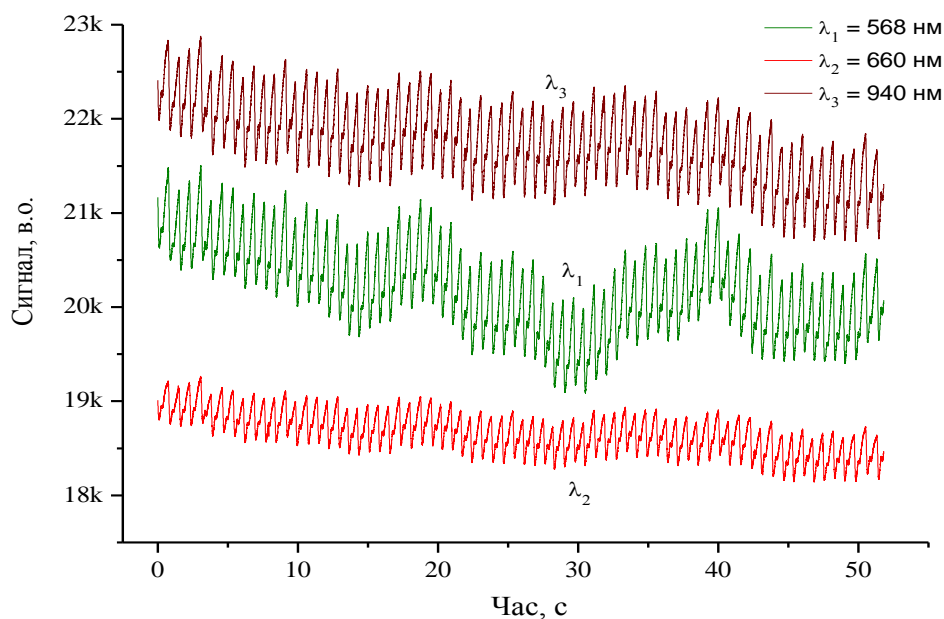
Дане дослідження проводилось з метою визначення ефективності міжфракційних змін в молекулах гемоглобіну в залежності від параметрів лазерного випромінювання та оцінки квантової ефективності взаємодії світла з оксигемоглобіном та карбокигемоглобіном, а також вивчення впливу температурних полів на процеси взаємодії лазерного випромінювання з комплексами гемоглобіну в умовах *invivo*.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Дослідне визначення концентрації карбоксигемоглобіну у курців

Визначення вмісту карбоксигемоглобіну в крові було проведено на волонтерах-курцях та некурящих. Запис сигналів здійснювався описаним вище трихвильовим пальцевим датчиком на протязі 50-60 секунд. Записані сигнали було оброблено за методикою, яка описана у власних патентах [46, 47]. Обчислювались парні коефіцієнти лінійної регресії та кореляції сигналів червоного-інфрачервоного та зеленого-червоного каналів. Коефіцієнти лінійної регресії мають фізичний зміст ідентичний відповідним відношенням коефіцієнтів модуляції, але надають можливість визначати фінальні показники, а саме величину насичення киснем артеріальної крові SaO_2 і відносну концентрацію карбоксигемоглобіну $SpCO$ за відрізок часу, що може бути нижчим від тривалості кардіоциклу.

На рисунку 3.1 зображено характерні фотоплетизмограми зеленого ($\lambda_{max} = 568$ нм = λ_1), червоного ($\lambda_{max} = 660$ нм = λ_2) та інфрачервоного ($\lambda_{max} = 940$ нм = λ_3) каналів, зняті у молодого здорового некурця, на рисунку 3.2 – обраховані зміни в часі коефіцієнтів кореляції C і лінійної регресії R сигналів червоного-інфрачервоного та червоного-зеленого каналів.



Рисунк 3.1. Фотоплетизмограми, записані 3-хвильовим датчиком у некурця.

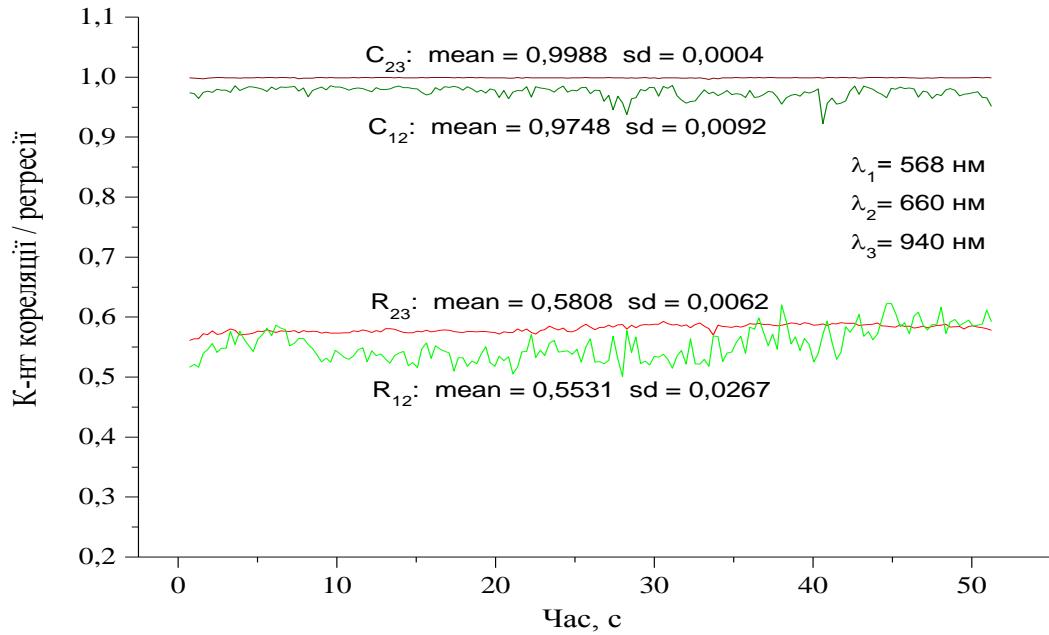


Рисунок 3.2. Зміни в часі коефіцієнтів лінійної регресії R та кореляції C і сигналів червоного-інфрачервоного і червоного-зеленого каналів рисунку 3.1.

На рисунку 3.3 зображено характерні фотоплетизмограми зеленого (568 нм), червоного (660 нм) та інфрачервоного (940 нм) каналів, визначені у помірному курця (менше 1 пачки цигарок за добу) після пари викурених сигарет; на рисунку 3.4 – зміни в часі коефіцієнтів кореляції C і лінійної регресії R сигналів червоного-зеленого і червоного-інфрачервоного каналів.

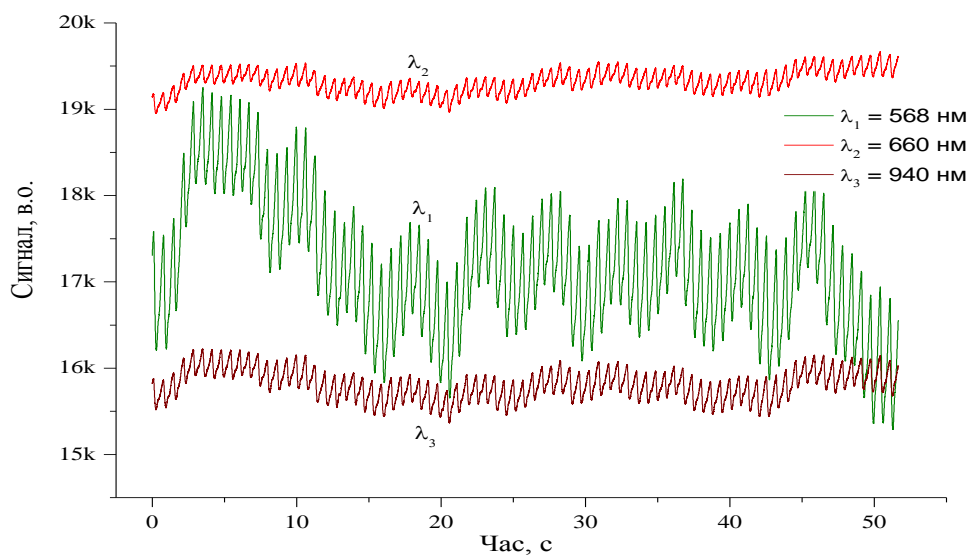


Рисунок 3.3. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком у помірному курця.

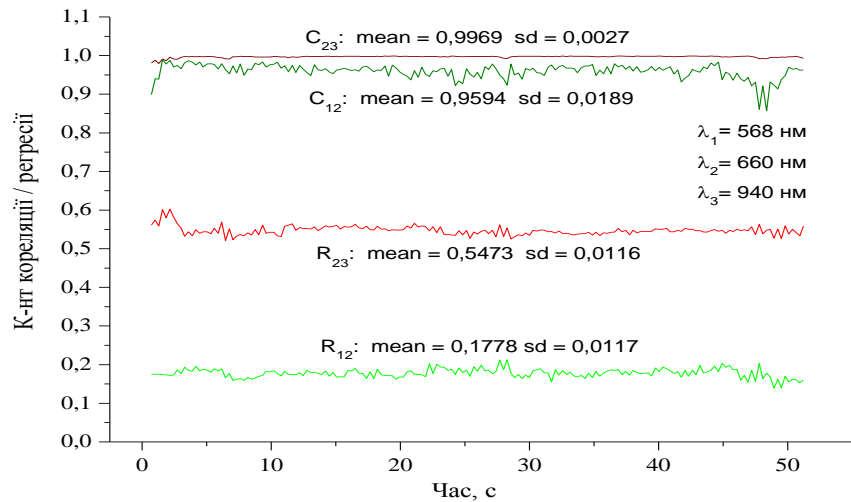


Рисунок 3.4. Зміни в часі коефіцієнтів кореляції С і лінійної регресії R сигналів червоного-зеленого і червоного-інфрачервоного каналів рисунку 3.3.

З наданих рисунків видні зміни поведінки сигналів фотоплетизмограм на визначених довжинах хвиль у курців порівняно з некурцями: зростає коефіцієнт модуляції зеленого каналу, і знижуються коефіцієнти модуляції ІЧ і особливо червоного каналів.

На рисунку 3.5 надано характерні фотоплетизмограми зеленого (568 нм), червоного (660 нм) та інфрачервоного (940 нм) каналів, замірені у помірному курця після 12-годинної паузи в курінні, на рис.3.4 – зміни в часі коефіцієнтів кореляції С і лінійної регресії R сигналів червоного-зеленого і червоного-інфрачервоного каналів.

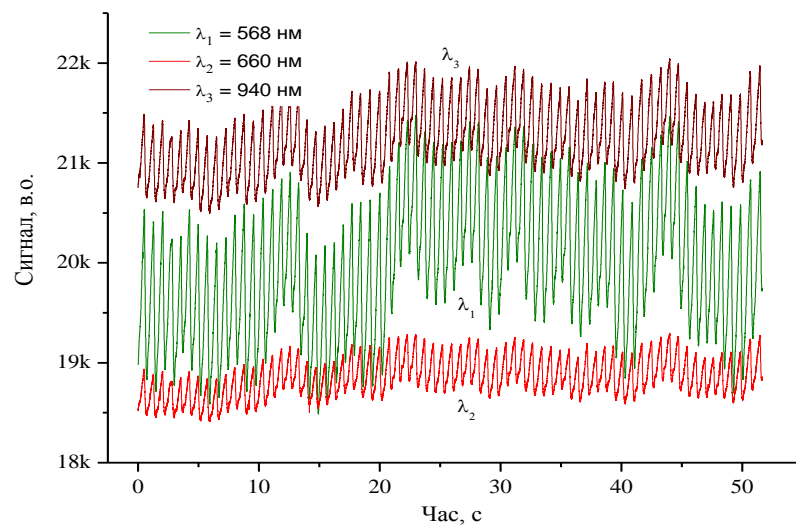


Рисунок 3.5. Фотоплетизмограми, записані 3-хвильовим датчиком після 12-годинної перерви паління у курця.

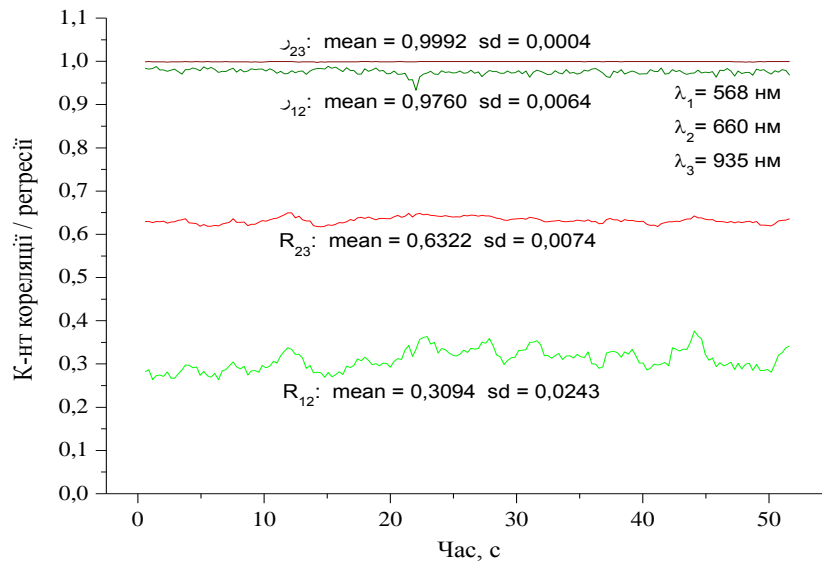


Рисунок 3.6. Зміни в часі коефіцієнтів кореляції C і лінійної регресії R сигналів червоного-зеленого і червоного-інфрачервоного каналів рисунку 3.5.

Після 12-годинної перерви в курінні показники відношення коефіцієнтів модуляції (і коефіцієнтів лінійної регресії) червоного і зеленого каналів очевидно вище, ніж у період паління (після кількох сигарет) і зближується до відповідних значень у некурців.

За весь час експериментів знялося більше сотні трихвильових фотоплетизмограм на курцях (до та після паління) і некурящих. Записи з сильними викидами і можливими шумами, такими, як на рисунку 3.7 і гірше, а також з низькими ($< 0,95$) і нестабільними коефіцієнтами кореляції зеленого і червоного каналів (рисунок 3.8) було виключено з подальшого аналізу.

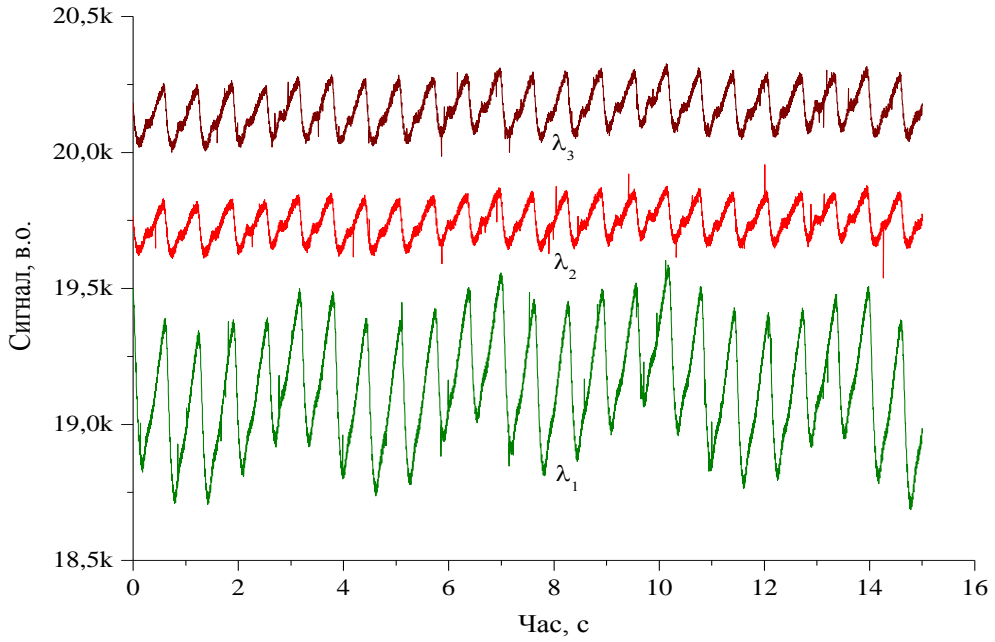


Рисунок 3.7. Приклад фотоплетизмограми з явними шумами і викидами сигналу.

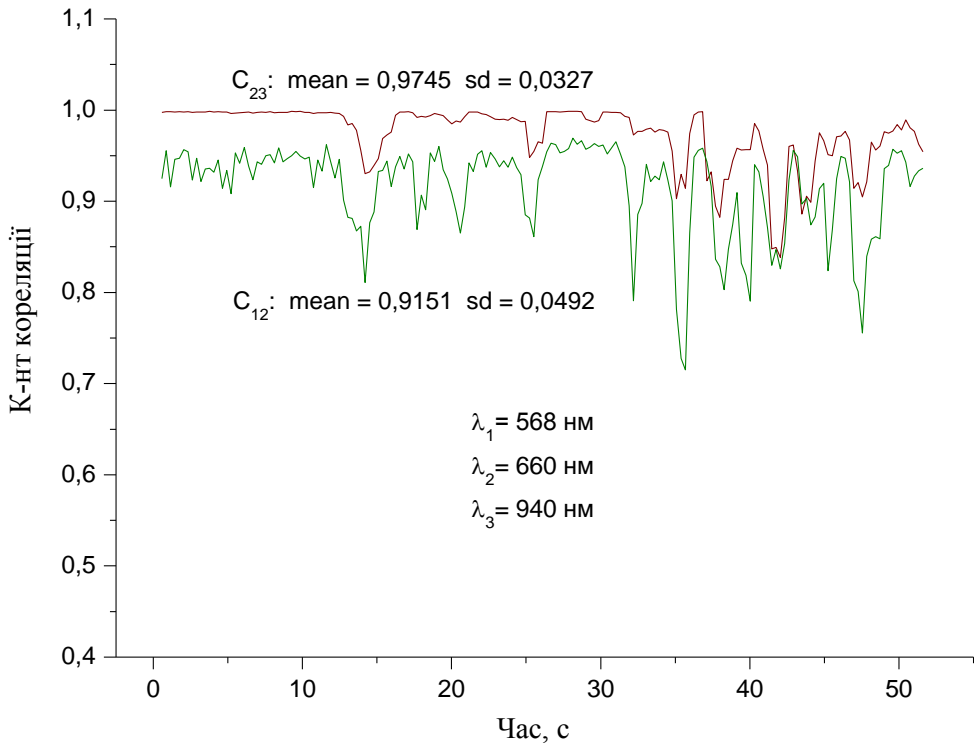


Рисунок 3.8. Приклад низького і нестабільного коефіцієнту кореляції ($C_{12} < 0,95$).

Статистика оброблених даних з обрахуванням відношення коефіцієнтів модуляції (або коефіцієнтів лінійної регресії) зеленого ($\lambda_1 = 568$ нм) і червоного ($\lambda_2 = 660$ нм) каналів зображена в таблиці скріншоту вікна «Origin» на рисунку 3.9.

	Col(X)	Mean(Y)	sd(yEr±)	Min(Y)	Max(Y)	Range(Y)	N(Y)
1	Smokers	6,02909	1,68537	3,02	10,8	7,78	55
2	Abstinance	2,79789	1,14636	1,72	6,7	4,98	19
3	Nonsmokers	2,75063	1,11191	1,18	4,86	3,68	16

Рисунок 3.9. Статистика замірів відношення коефіцієнтів модуляції зеленого і червоного каналів у курців під час паління, після 12-години перерви та некурців.

Середнє значення коефіцієнтів лінійної регресії сигналів зеленого і червоного каналів при аналізі помірних курців (менше 1 пачки цигарок за добу) склало $R_{12} = 6,05 \pm 1,68$; діапазон значень – від 3,01 до 10,7. При цьому середній показник сатурації артеріальної крові $SaO_2 = 95,07 \pm 1,22$ (лінійна регресія червоного і ІЧ каналів $R_{23} = 0,536 \pm 0,007$).

В паліїв після 12-годинної перерви від куріння $R_{12} = 2,80 \pm 1,15$ в діапазоні значень від 1,73 до 6,8; $SaO_2 = 94,15 \pm 1,12$ ($R_{23} = 0,566 \pm 0,007$).

У некурців $R_{12} = 2,75 \pm 1,11$ в діапазоні від 1,17 до 4,86; $SaO_2 = 92,73 \pm 2,05$ ($R_{23} = 0,60 \pm 0,013$).

Різниці у значеннях R_{12} між першою і другою та першою і третьою групами можуть вважатися статистично достовірними ($P > 0,95$); показники другої і третьої груп є дуже схожими. Слід звернути увагу на достатньо високий розкид визначень коефіцієнтів лінійної регресії R_{12} зеленого і червоного каналів, діапазони значень R_{12} у всіх трьох групах є перекритими. Ці дані повністю погоджуються із даними статистики по визначенню карбоксигемоглобіну в крові курців і тих хто не палить, що наведені в літературі [20, 48].

Власне в результаті експериментів було створено трихвильовий датчик для визначення вмісту карбоксигемоглобіну в крові за використанням

неінвазивного методу у розсіяному назад світлі із застосуванням найбільш сильної смуги поглинання HbCO (568 нм) у видимому та близькому ІЧ діапазоні. Експериментальні дослідження показали істинну різницю між співвідношеннями коефіцієнтів модуляції сигналів зеленого та червоного (і ІЧ) каналів у некурців ($R_{12} = 2,75 \pm 1,11$) та курящих ($R_{12} = 6,03 \pm 1,69$; $P > 0,95$), у паліїв до і після паління.

3.2 Програмне забезпечення для обрахування SaO₂ і HbCO

Для автоматизації обрахувань значень сатурації артеріальної крові киснем SaO₂ а також відносної концентрації карбоксигемоглобіну HbCO за даними трихвильових фотоплетизмограм було написано спеціфічну програму на мові C⁺⁺. В програмі було реалізовано алгоритм, описаний у власних патентах [47,49]. Програмою відбувається зчитування масиву даних від сигналів фотоплетизмограми на трьох довжинах хвиль, записаних за допомогою вимірювального блоку у файл *.log (або *.dat). Для заданого вікна вимірювань, наприклад, 400 точок, відбувається обчислення коефіцієнтів кореляції і лінійної регресії які задані у вікні програми пар каналів (червоний-інфрачервоний, зелений-червоний). Процес обрахування продовжується із заданим зсувом вікна вимірювань (наприклад, 100 точок) до закінчення масиву даних. При цьому відбувається прив'язування обчислених значень відповідно до шкали часу за заданого періоду опитування фотоприймача вимірювальним блоком ($T = 1/f = 1/348 \text{ Гц} = 0,00287 \text{ с}$). За допомогою значень коефіцієнтів лінійної регресії на кожному вікні обраховуються величини насичення артеріальної крові киснем SaO₂ а також відносної концентрації карбоксигемоглобіну HbCO. Після закінчення циклу обрахувань (тривалістю кілька десятих секунди для файлу даних, що були записані протягом однієї хвилини) середні значення SaO₂ і HbCO відображаються на екрані у вікні програми (рисунок 3.10). Повний масив обрахованих коефіцієнтів кореляції, коефіцієнтів лінійної регресії, значень SaO₂ і HbCO на заданій дискретності (для наведеного прикладу $\approx 0,28 \text{ с}$) при обрахуванні записуються у файл *.mod за заданою адресою.

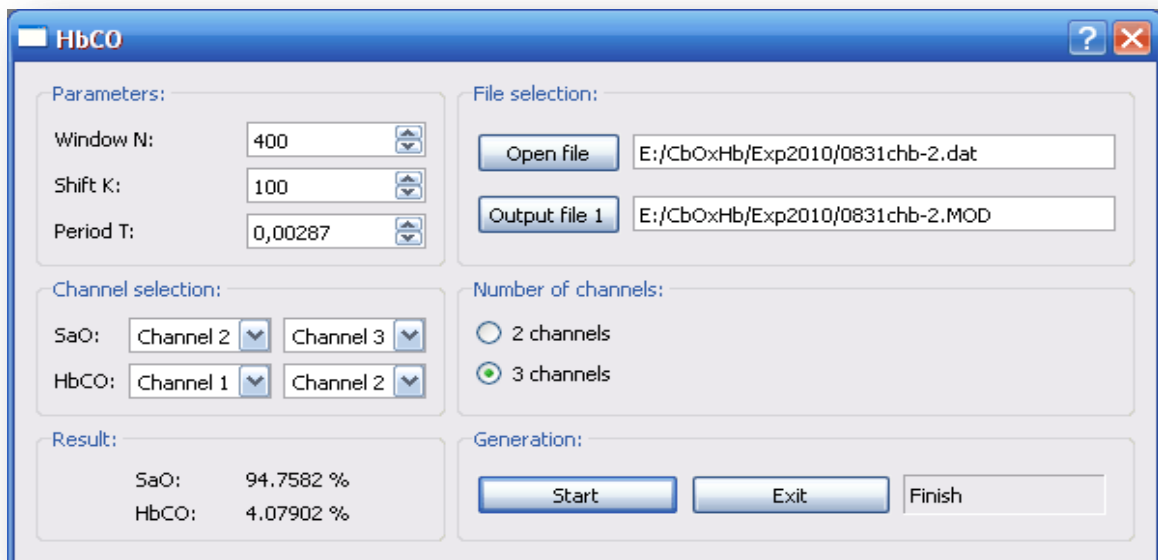


Рисунок 3.10. Скріншот вікна програми обрахування SaO_2 і HbCO .

Для визначення значень SaO_2 і HbCO у реальному масштабі часу було створено та написано другу редакцію програми з використанням графічного інтерфейсу користувача для ОС Windows. Приклад вікна програми з обрахованими значеннями SaO_2 , концентрації HbCO та відповідних коефіцієнтів кореляції сигналів фотоплетизмограм наведено на рисунку 3.11. Програма дає змогу оброблювати сигнали трьох каналів фотоплетизмограми в реальному часі під час вимірювань або звертаючись до файлу, в який відбувається запис даних.

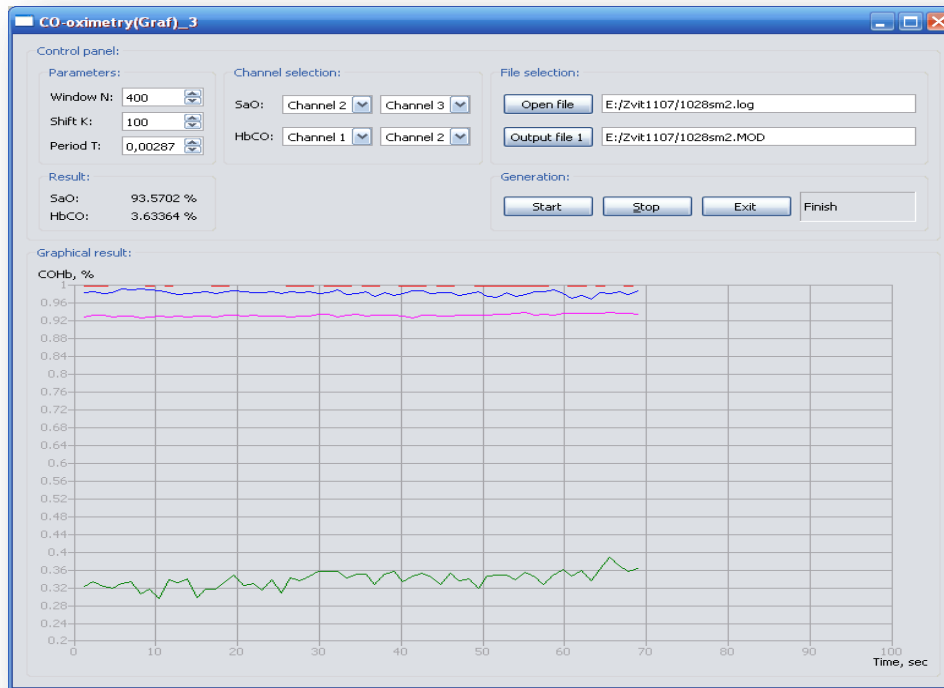


Рисунок 3.11. Вікно програми обрахування SaO₂ і концентрації HbCO за допомогою сигналів трихвильового датчика. Показники вимірювань на пальці помірною курця.

3.2. Дослідження характеру змін концентрації карбоксигемоглобіну під час паління

Експериментальне визначення змін відносного вмісту карбоксигемоглобіну та сатурації артеріальної крові у палія під час куріння здійснювалося з використанням 3-хвильового пульсоксиметричного датчика з довжиною хвиль $\lambda_1 = 568$ нм, $\lambda_2 = 660$ нм, $\lambda_3 = 940$ нм, вимірювального блоку та комп'ютера із програмним забезпеченням, що було описано раніше. Вимірювання були проведені до початку та під час куріння, а також через 5-10 хвилин після кожної зкуреної цигарки з інтервалами в 1 годину. Результати замірів зображені на рисунках 3.12 -3.14.

При закінченні 10-годинної паузи від куріння відносна концентрація HbCO була у межах 1,6-2,4 %. Під час куріння пікові концентрації були на рівні 6-9 %, а після паління знижувалися до певного фонового рівня, що був вищий від початкового на 0,5-2,5% в залежності від кількості викурених до цього

цигарок та особливостей фізіологічного стану організму. Після 5-6-ти цигарок фоновий рівень досягав 4-6% НbCO.

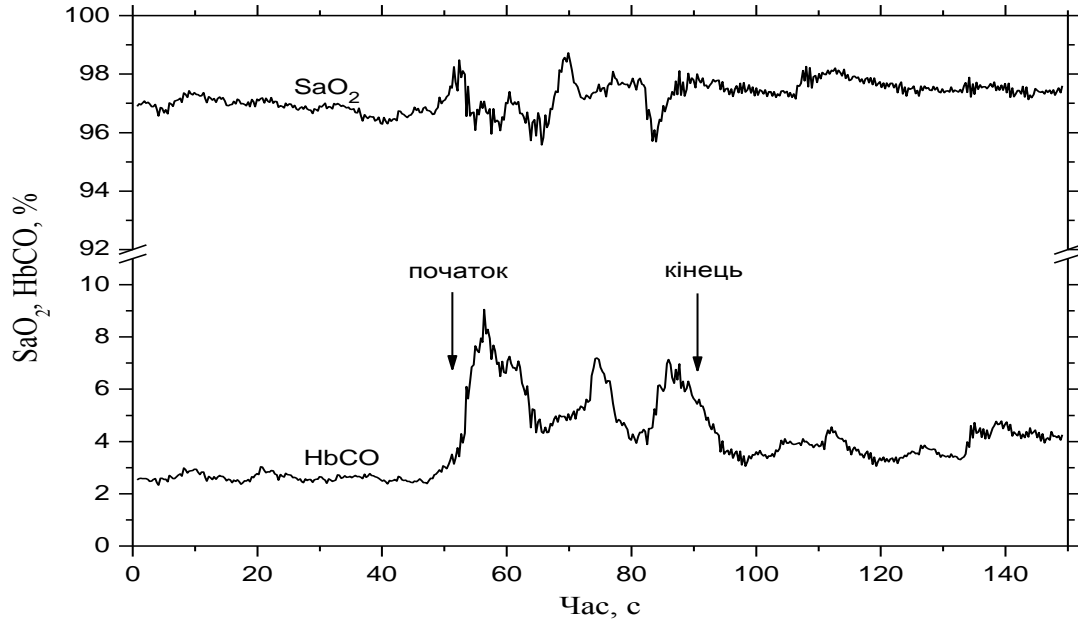


Рисунок 3.12. Зміни у відносній концентрації НbCO під час паління (з 52-ї до 93-ї сек.). Приклад 1.

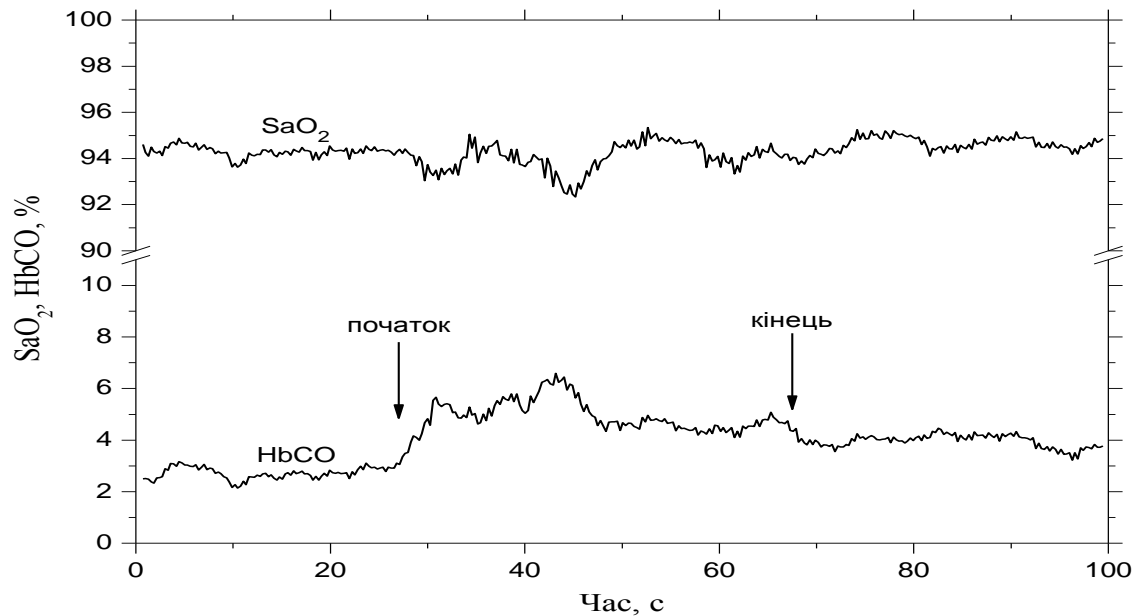


Рисунок 3.13. Зміни у відносній концентрації НbCO під час паління (з 27-ї до 67-ї сек.). Приклад 2.

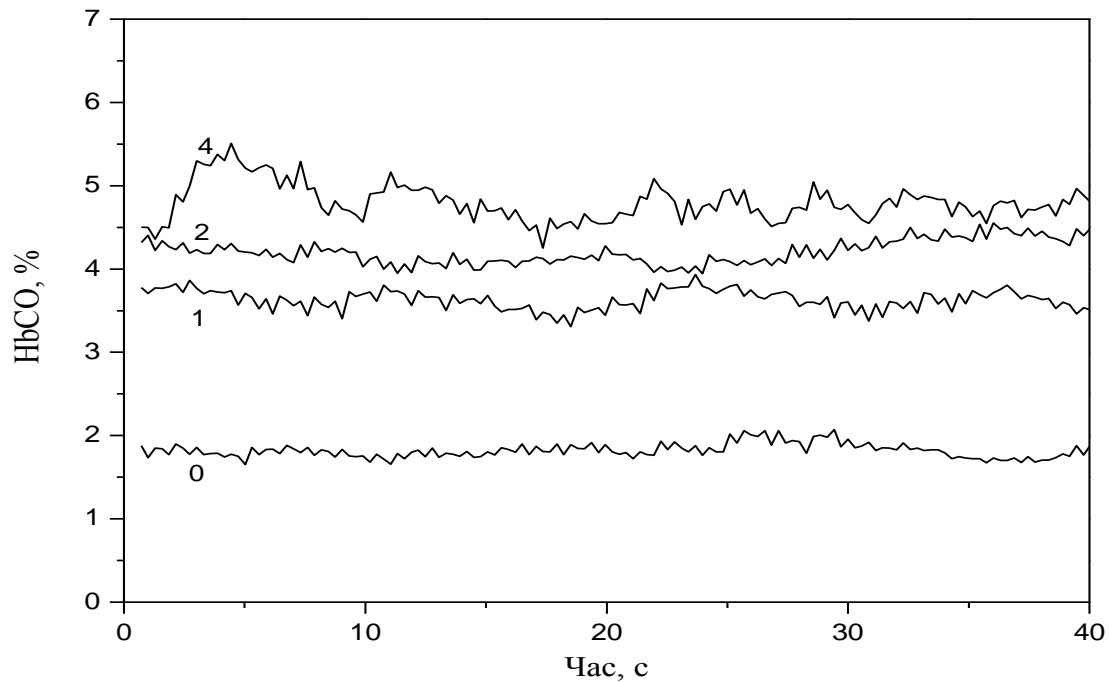


Рисунок 3.14. Збільшення відносної концентрації HbCO в залежності від кількості викурених цигарок : 0 – до паління; 1 – після 1-ї сигарети; 2 – після 2-ї; 4 – після 4-ї.

В досліді було спостережено також незначний ріст реєстрованих значень сатурації артеріальної крові в результаті куріння на 0,5-1,5%, що зумовлено впливом карбоксигемоглобіну на обраховане стандартним пульсоксиметричним способом значення SaO_2 . Для стандартного визначення SaO_2 використовуються фотоплетизмограми сигналів на довжині хвиль 660 і 940 нм. Поглинання HbCO в області 940 нм є майже нульовим, 650 нм є ізобестичною точкою окси- і карбоксигемоглобіну, а в областях від 600 до 650 нм коефіцієнт поглинання HbCO є помітно вищим ніж для оксигемоглобіну. Цю особливість варто враховувати для модернізації конструкції багатохвильового датчика для CO-оксиметрії а також безпосередньо програмного забезпечення для обчислення SaO_2 і концентрації HbCO.

3.3. Визначення та аналіз змін та характеру фізичних процесів в комплексах гемоглобіну при взаємодії з лазерним випромінюванням

У випадку експериментального дослідження впливу зовнішнього випромінювання на оксигемоглобін HbO_2 і карбоксигемоглобін HbCO в крові *in vivo* використовувалося 18 різних джерел випромінювання (світлодіоди і лазерні діоди) у видимій та ближній ІЧ області спектру з довжиною хвиль 405; 470; 505; 525; 568; 590; 605; 625; 635; 650; 660; 700; 780; 808; 850; 860; 880 і 940 нм.

Для кожного джерела було підібрано певний струм живлення, щоб, по можливості було забезпечено потужність випромінювання, яка б відповідала однакової кількості фотонів, що потрапляє на опромінювану ділянку шкіри на різних довжинах хвиль. Оцінка потужності відбувалася вимірювачем середньої потужності і енергії лазерного випромінювання ИМО-2Н і варіювалася від 20 мВт для $\lambda = 405$ нм до 8 мВт для $\lambda = 940$ нм. Виходячи з цього потужності опромінення шкіри з урахуванням вихідної апертури джерел були взяті від 50 до 125 мВт/см². У деяких випадках для зниження потужності використовувались нейтральні світлофільтри з використанням засвічених та проявлених фотоплівок, вирізаних за діаметром вихідного отвору джерела.

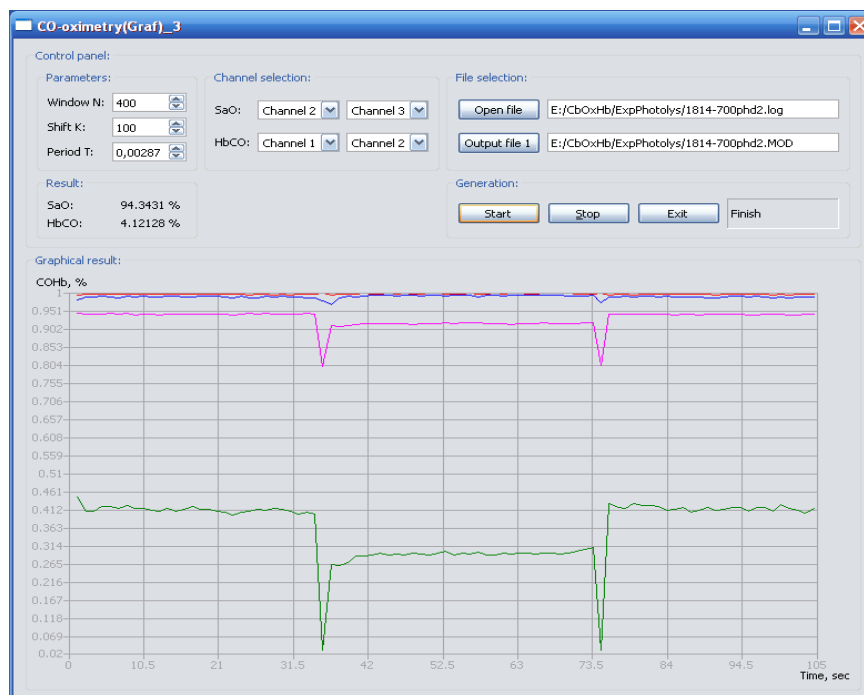


Рисунок 3.15. Вікно програми обрахування SaO_2 і концентрації HbCO за сигналами трихвильового датчика в процесі фотолізу

В першій хвилі експериментів світлодіоди або лазерні діоди було введено в корпус трихвильового пульсоксиметричного датчика спереду таким чином, щоб прямий світловий потік не потрапляв на поверхню фотоприймача а лише опромінювалась нижня передня частина першої фаланги пальця. Відстань від зовнішнього джерела дії до фотоприймача становила близько 5 мм. Вимірювання було проведено на пальцях помірних курців з середнім вмістом карбоксигемоглобіну в крові від 4 до 6%. Для пізнання впливу кожного з джерел було записано від 10 до 25 трихвильових наборів фотоплетизмограм принципом: 30-40 с без випромінювання, 30-40 с при ввімкненому випромінюванні і 30-40 с знову без випромінювання.

Приклади характеру змін сигналів трихвильового датчика і обчислених SaO_2 і HbCO при впливі випромінювання різних довжин хвиль на першу фалангу пальця відображено на рисунках 3.16 – 3.33

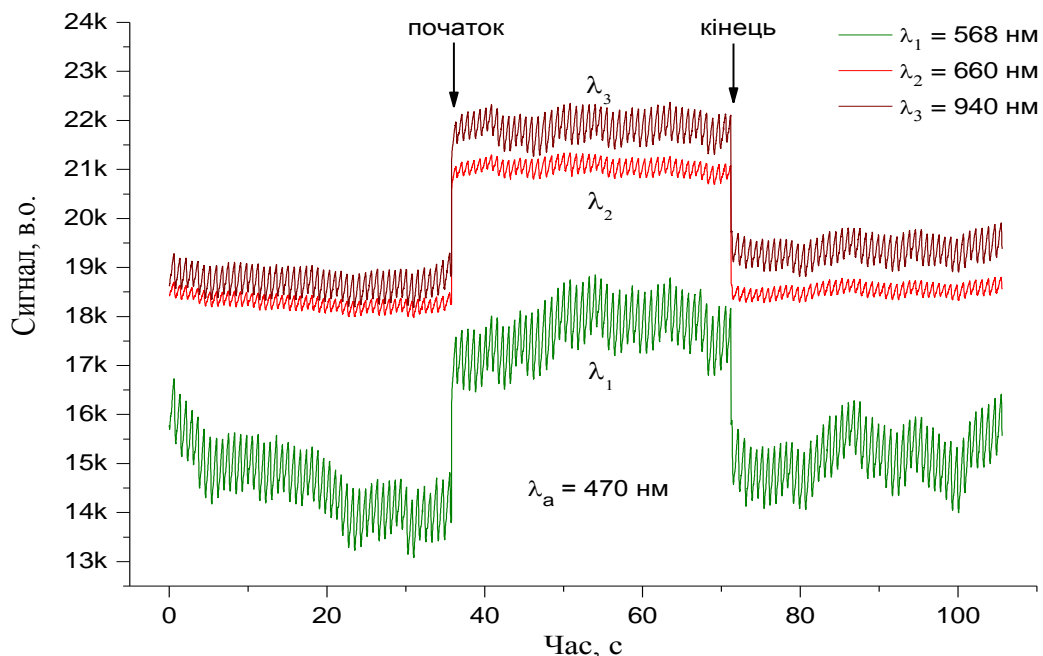


Рисунок 3.16. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком без і під час випромінювання 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 470 нм.

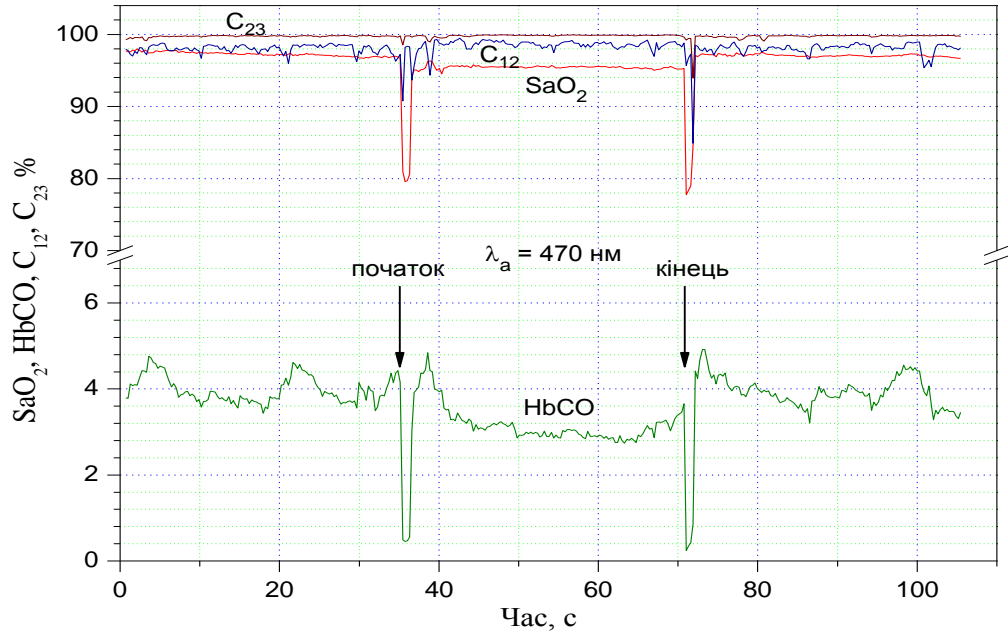


Рисунок 3.17. Вплив випромінювання LED L-7113PVC-H (470 нм, 18 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

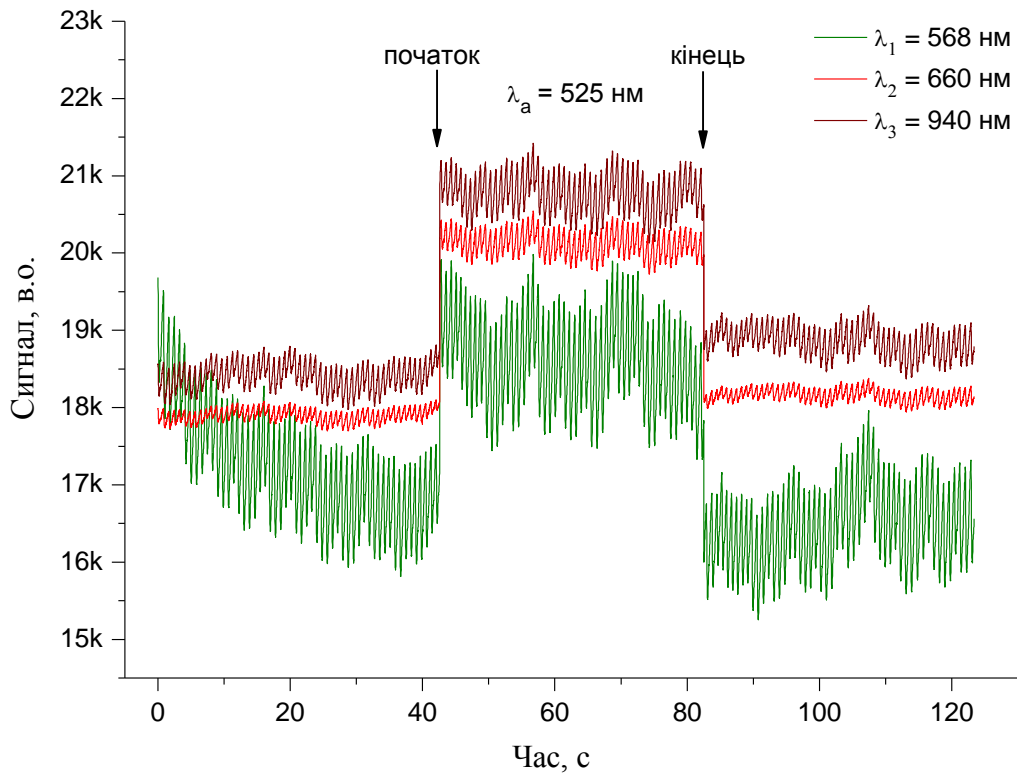


Рисунок 3.18. Фотоплетизмограми, що були зняті 3-хвильовим датчиком без при опроміненні 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 525 нм.

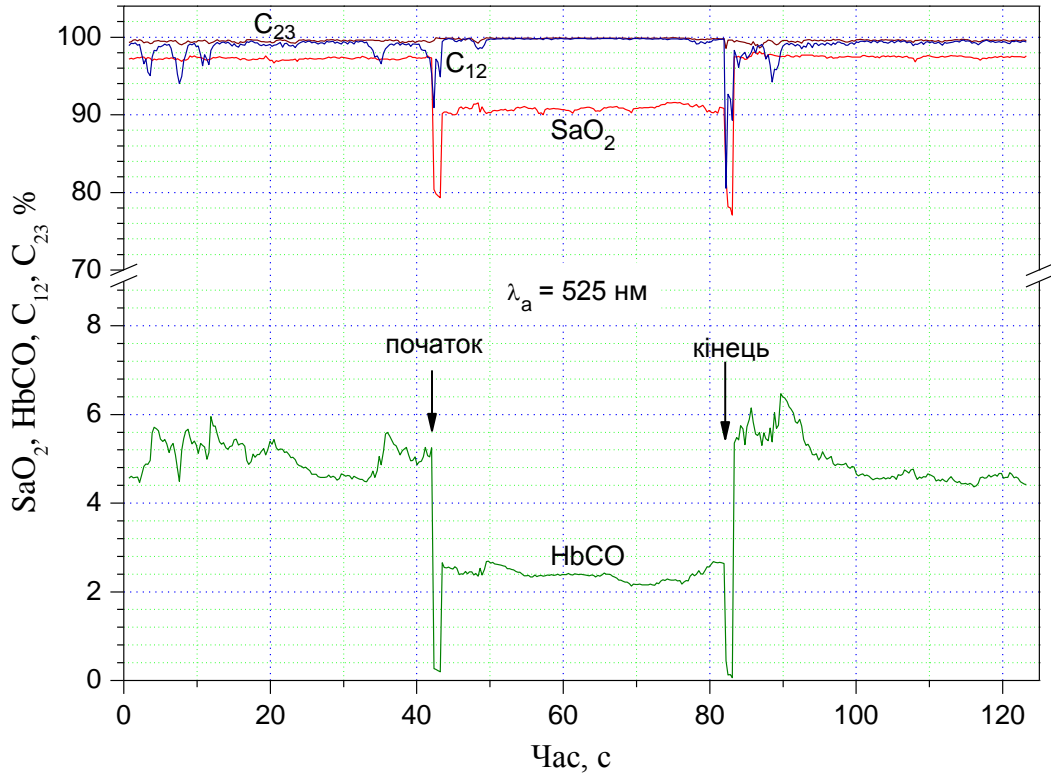


Рисунок 3.19. Вплив випромінювання LED L-7113VGC-H (525 нм, 16 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

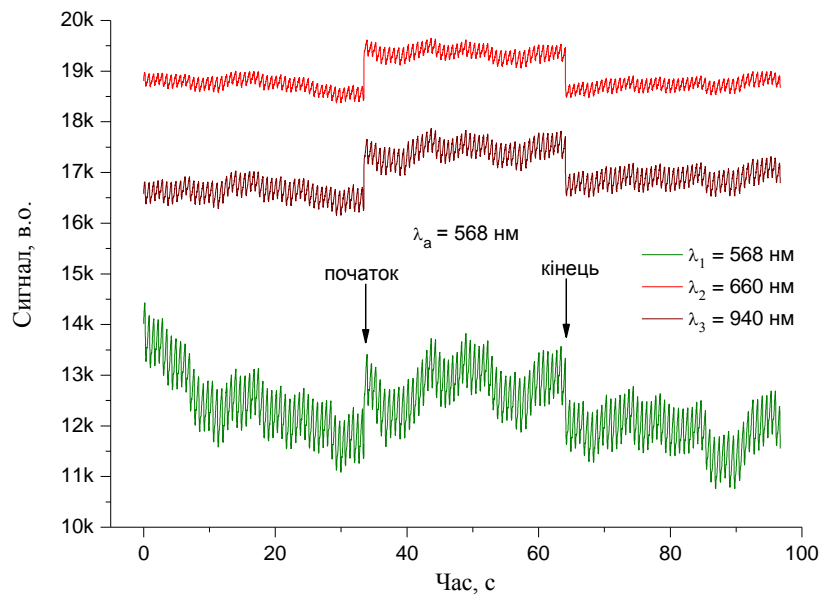


Рисунок 3.20. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком до та в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 568 нм.

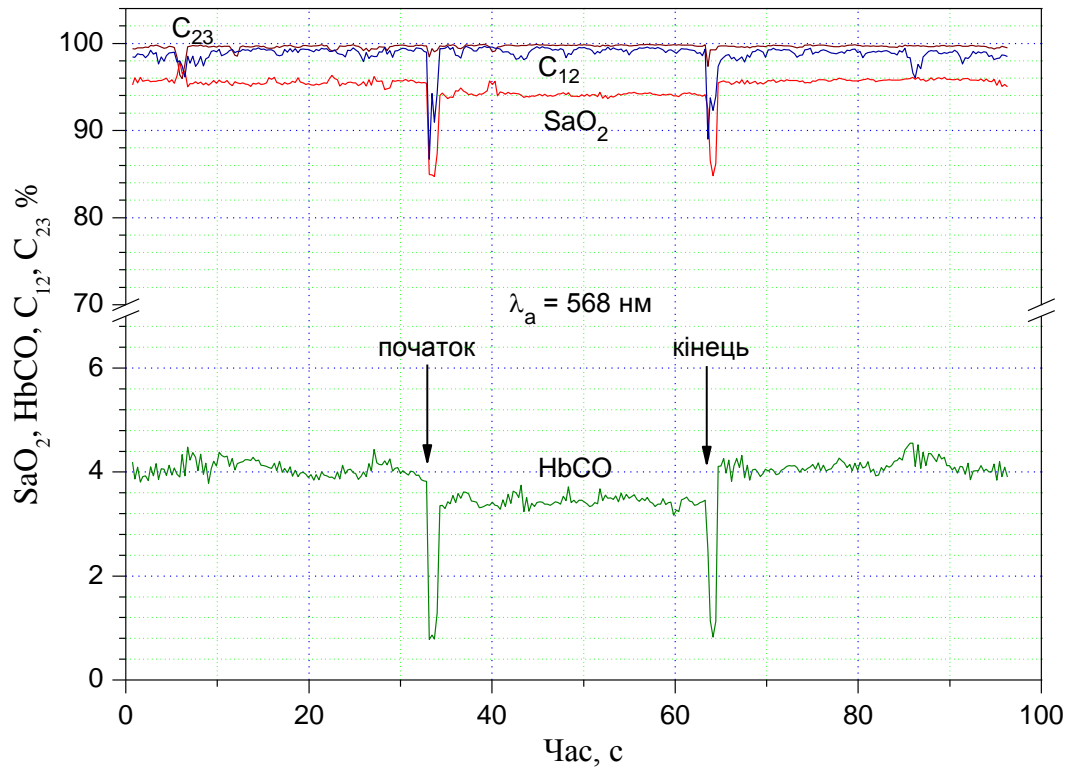


Рисунок 3.21. Вплив випромінювання LED L-53MGC (568 нм, 14 мВт) на SaO₂ і HbCO. C₁₂ і C₂₃ – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

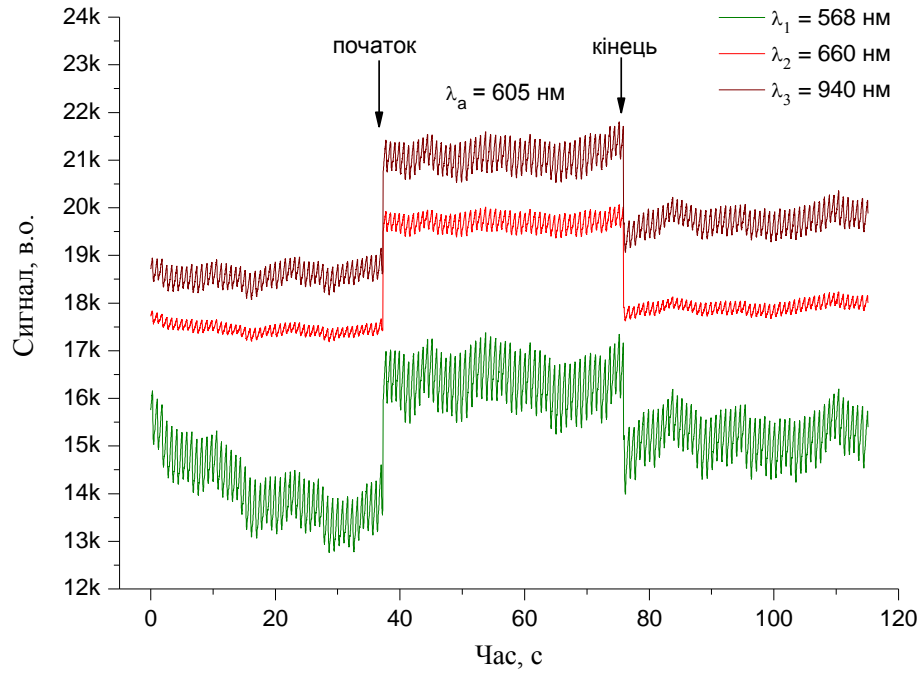


Рисунок 3.22. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком до та в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 605 нм.

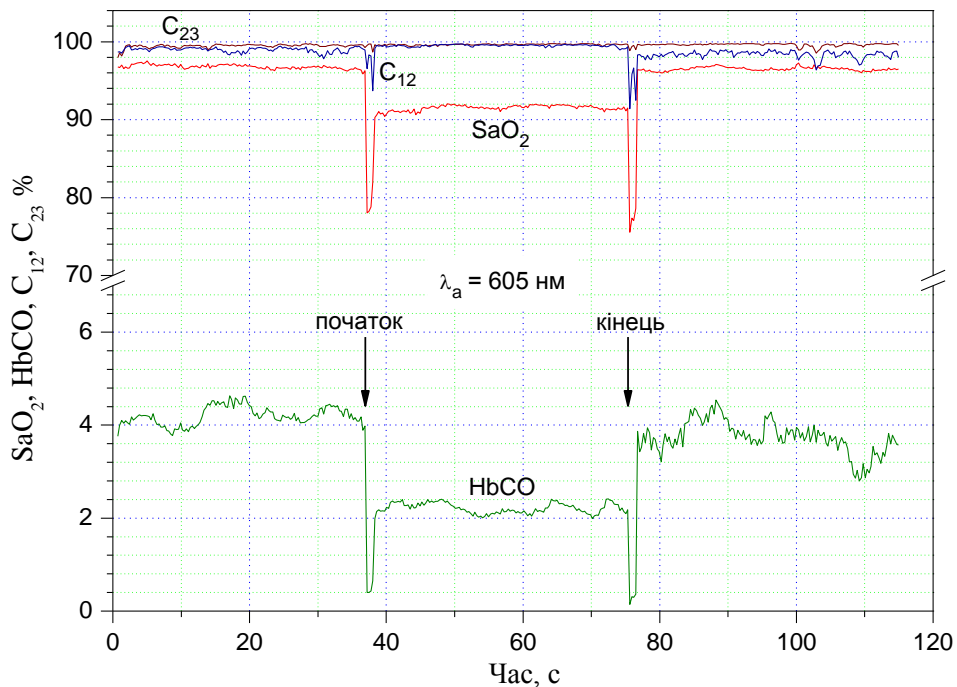


Рисунок 3.23. Вплив випромінювання LED L-934SEC (605 нм, 13 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

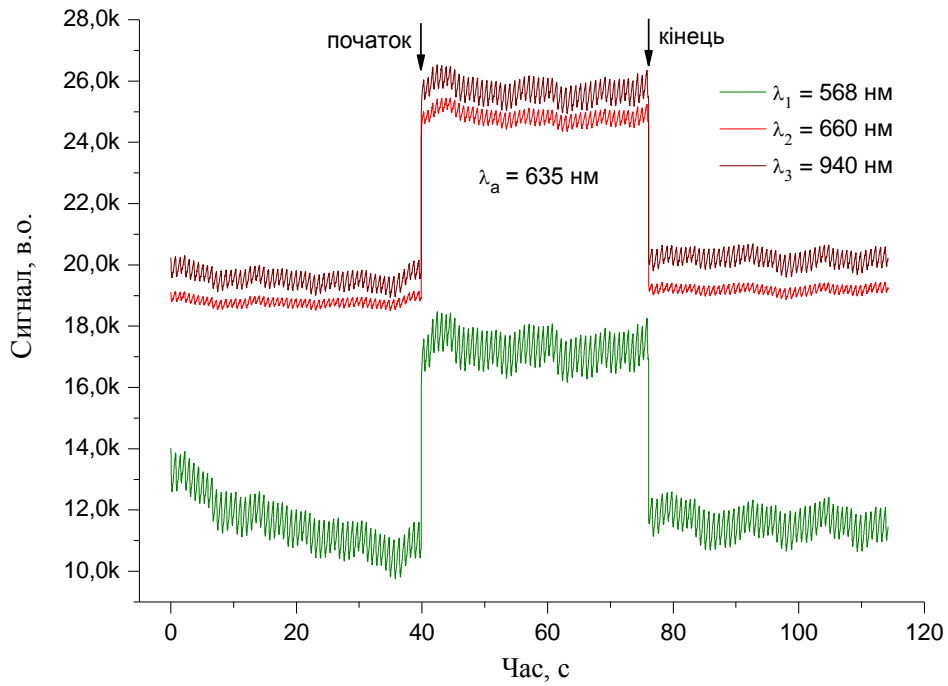


Рисунок 3.24. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком до та в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 635 нм.

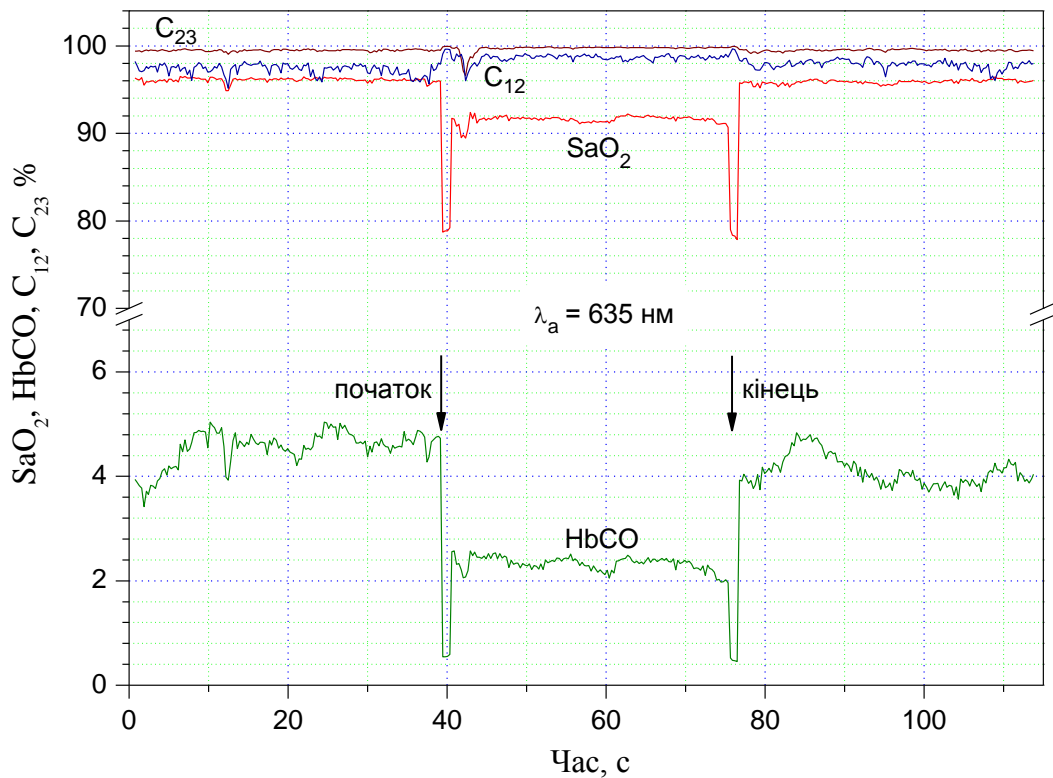


Рисунок 3.25. Вплив випромінювання LED L-1633SURC-E (635 нм, 13 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

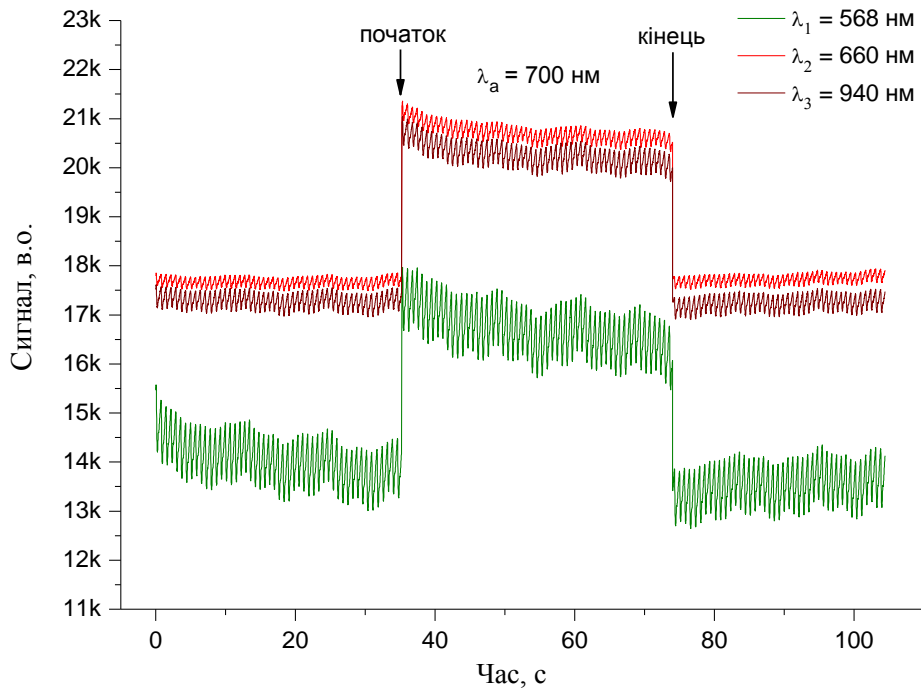


Рисунок 3.26. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком до та в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 700 нм.

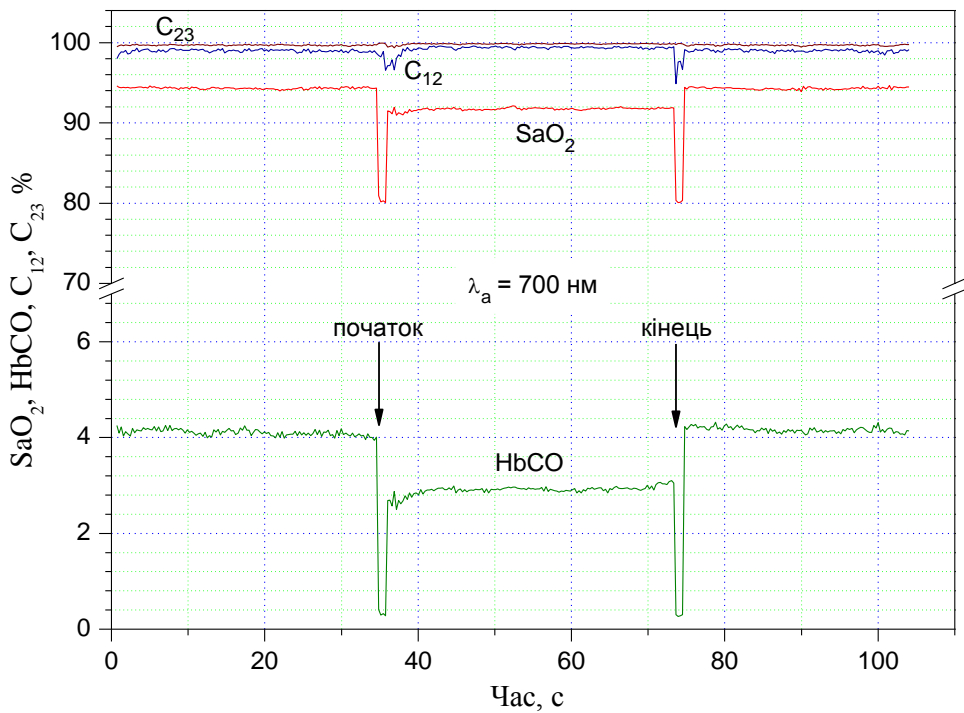


Рисунок 3.27. Вплив випромінювання LED GNL-3014HD×2 (700 нм, 11 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

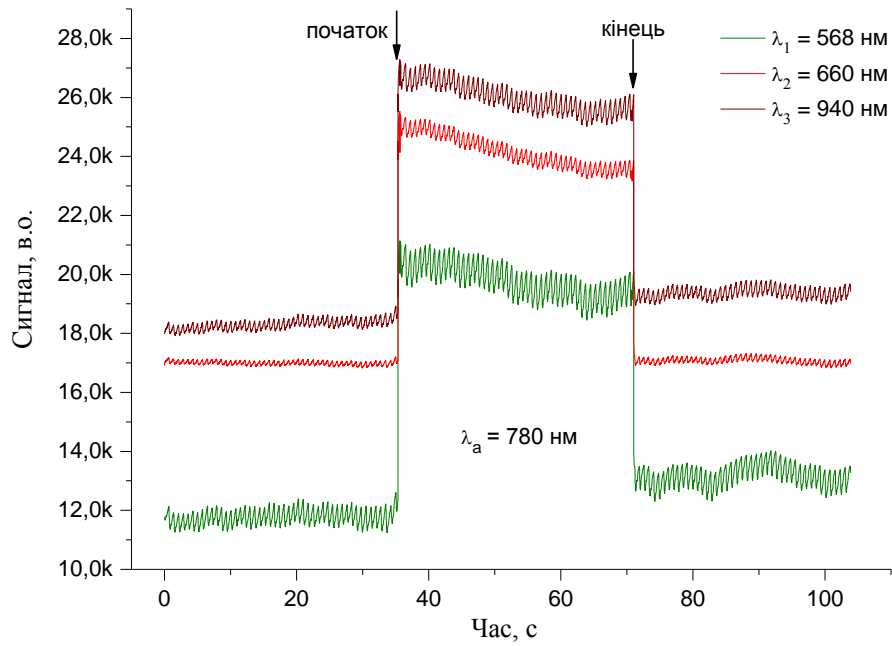


Рисунок 3.28. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком до та в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 780 нм.

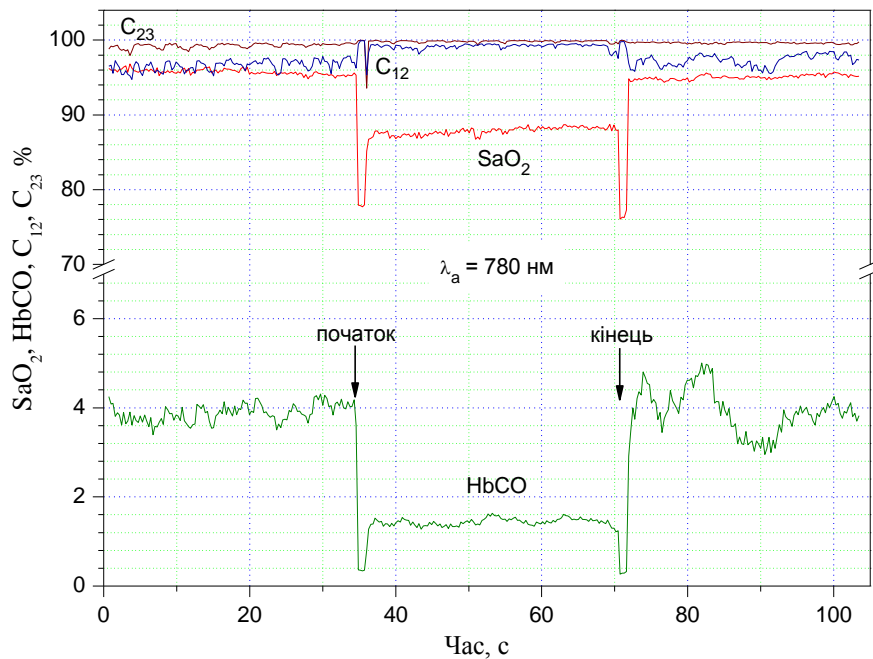


Рисунок 3.29. Вплив випромінювання LD HLDH-780-A-90-01 (780 нм, 10 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

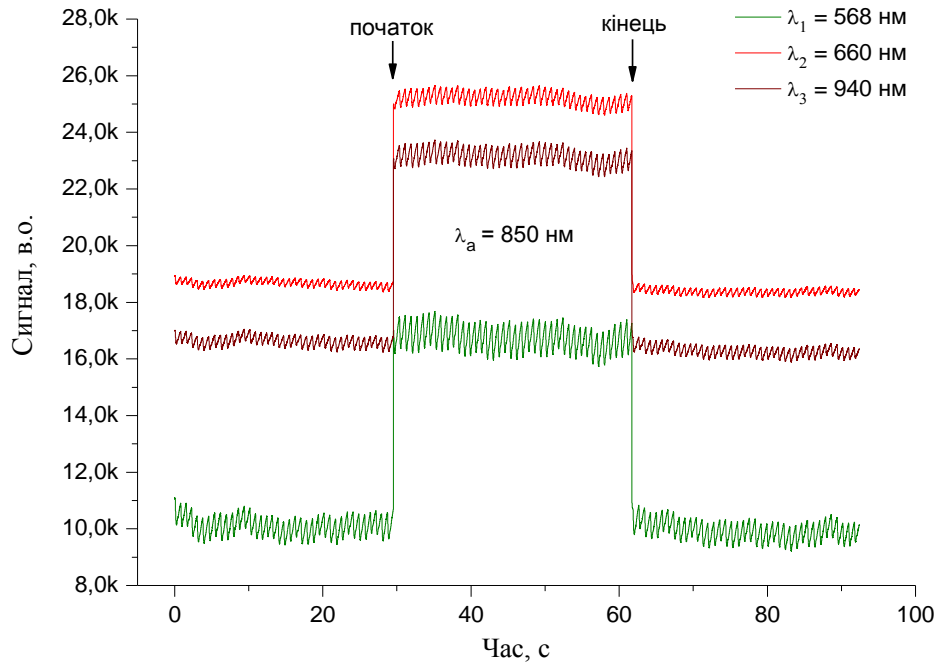


Рисунок 3.30. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком до та в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 850 нм.

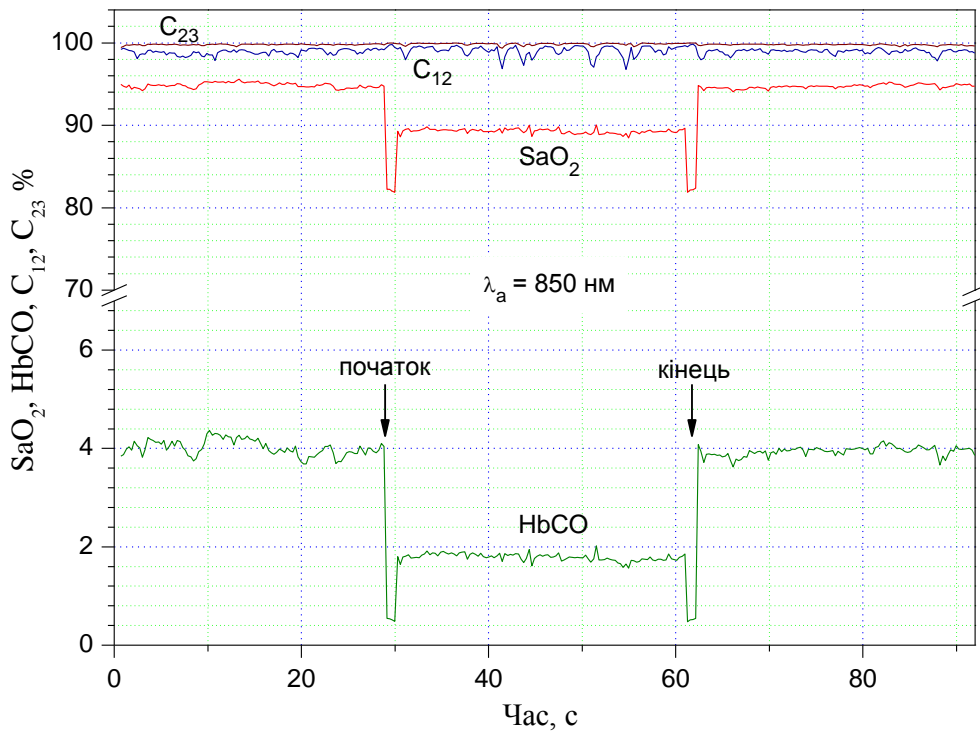


Рисунок 3.31. Вплив випромінювання LED L-53SF7C (850 нм, 10 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

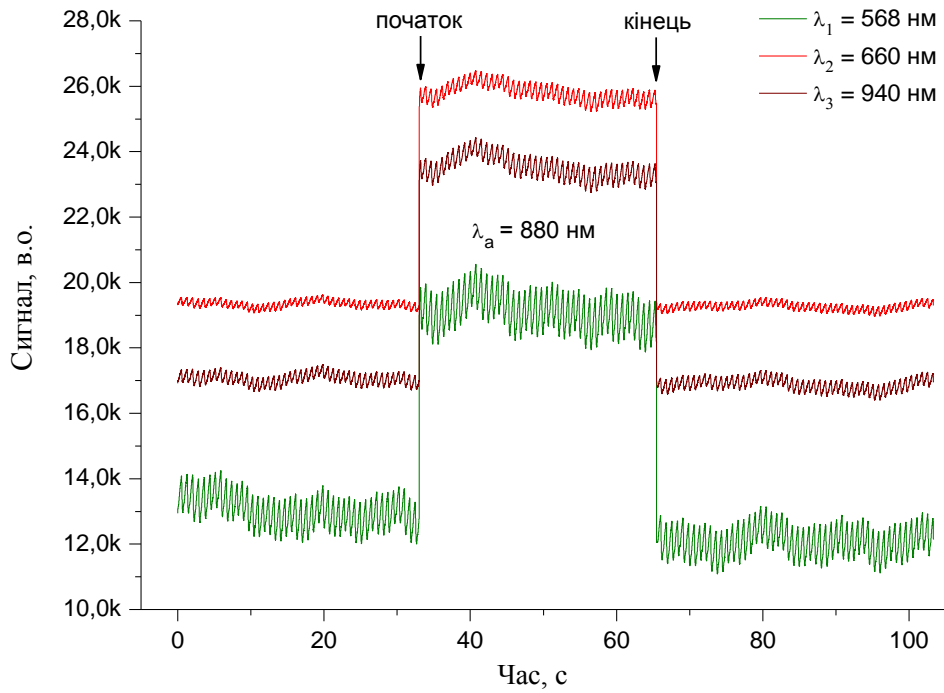


Рисунок 3.32. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком до та в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця довжиною хвилі 880 нм.

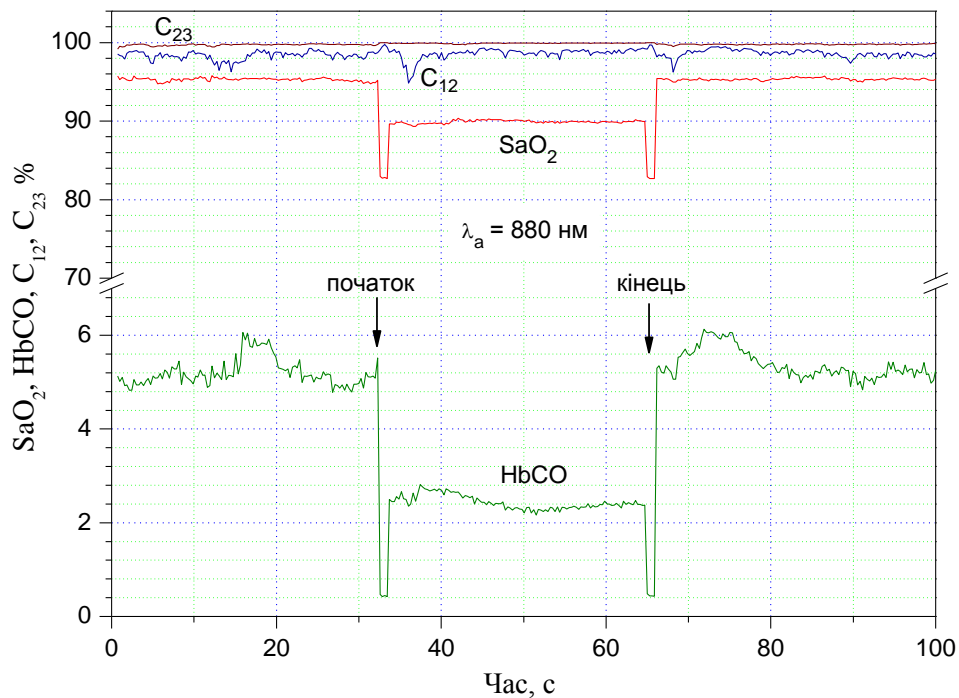


Рисунок 3.33. Вплив випромінювання LED SFH487-4 (880 нм, 9 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

По кожному графіку характеру змін відносних концентрацій окси- та карбоксигемоглобіну було обчислено середні значення SaO_2 і $HbCO$ на проміжках без та в процесі опромінення. Результати оброблялись з відповідним пакетом програми Origin 7.5 та обчислювались похибки значень для ймовірності $P = 0,95$ з використанням таблиці Ст'юдента. Приклад вікна статистики (для $\lambda = 780$ нм) відображено на рисунку 3.34.

	File	SaO	SaO'	DSaO	HbCO	HbCO'	DHbCO
1	0319-780-1	96,8	92,2	4,6	3,2	1,5	1,7
2	0319-780-2	95,8	91,4	4,4	3,4	2,1	1,3
3	0319-780-3	96,5	92,5	4	3,2	1,9	1,3
4	0321-780-1	93,6	90,5	3,1	2,6	1,7	0,9
5	0321-780-2	95,9	91,8	4,1	4,8	2,5	2,3
6	0321-780-3	95	92,4	2,6	5,7	3,5	2,2
7	0321-780-4	94,2	91,3	2,9	4,5	2,6	1,9
8	0321-780-5	94,3	90,8	3,5	4	2,2	1,8
9	0321-780-6	95,3	90,7	4,6	3,7	1,8	1,9
10	0321-780-7	95,8	91,9	3,9	5,9	3,5	2,4
11	0321-780-8	95,9	90,4	5,5	4,3	1,8	2,5
12	0321-780-9	96	92,1	3,9	5,8	3,1	2,7
13	0322-780-1	96,4	91,9	4,5	5	2,4	2,6
14	0322-780-2	96,6	90,5	6,1	6,1	2,6	3,5
15	0322-780-3	94,8	90,8	4	5,4	3,2	2,2
16	0322-780-4	96	90,3	5,7	6	2,9	3,1
17	0322-780-5	95,3	89	6,3	4,8	2,2	2,6
18	0322-780-6	95,8	91	4,8	3,8	1,7	2,1
19	0322-780-7	95,2	88,2	7	3,9	1,5	2,4
20	0326-780-1	94,5	90	4,5	5	2,2	2,8
21	0327-780-1	95,3	90,3	5	4,2	2,1	2,1
22	Statistics						
23	Mean	95,48	90,95	4,52	4,54	2,33	2,2
24	SD	0,85	1,1	1,13	1,04	0,62	0,61
25	E[0,95]	0,39	0,5	0,51	0,47	0,28	0,28

Рисунок 3.34. Статистика замірів змін SaO_2 і $HbCO$ при дії випромінювання лазерного діоду LD HLDH-780-A-90-01. SaO і $HbCO$ – середні значення без опромінення, SaO' і $HbCO'$ – під час опромінення; $DSaO$ і $DHbCO$ – абсолютні зміни значень SaO_2 і $HbCO$ під час дії опромінення.

У відповідності з даними статистичного аналізу результатів вимірювань для всіх джерел отримано значення відносних концентрацій окси- і карбоксигемоглобіну без і в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця в

залежності від довжини хвилі діоду, зображених на рисунку 3.35. В той самий час абсолютні зміни значень SaO_2 і HbCO в залежності від довжини хвилі випромінювання наведено на рисунку 3.36.

Відомо що середні значення SaO_2 і HbCO без опромінення для серій дослідів з різними довжинами хвиль трохи різняться, доцільним є навести величину ефекту до первинних значень. На рисунку 3.37 надано відносні показники змін SaO_2 і HbCO – $\Delta\text{SaO}_2/\text{SaO}_2$ і $\Delta\text{HbCO}/\text{HbCO}$ під час опромінення у процентному відношенні.

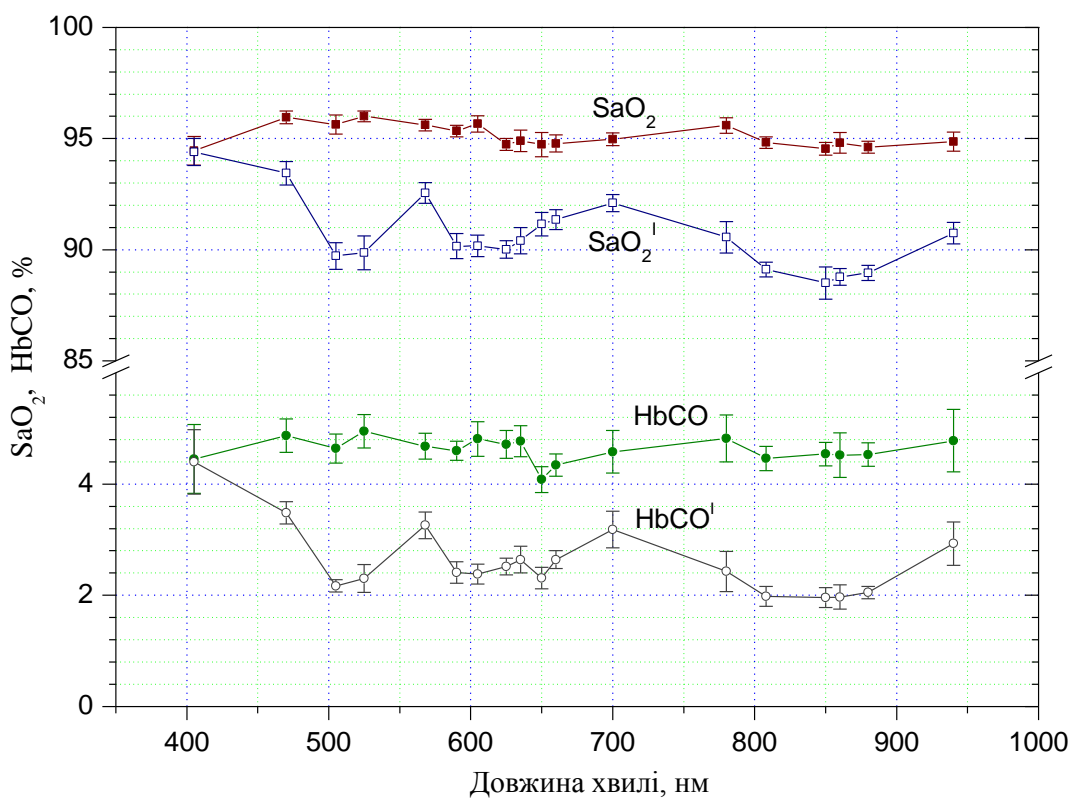


Рисунок 3.35. Середні показники SaO_2 і HbCO без та в процесі опромінення (SaO_2' і HbCO') 1-ї фаланги пальця.

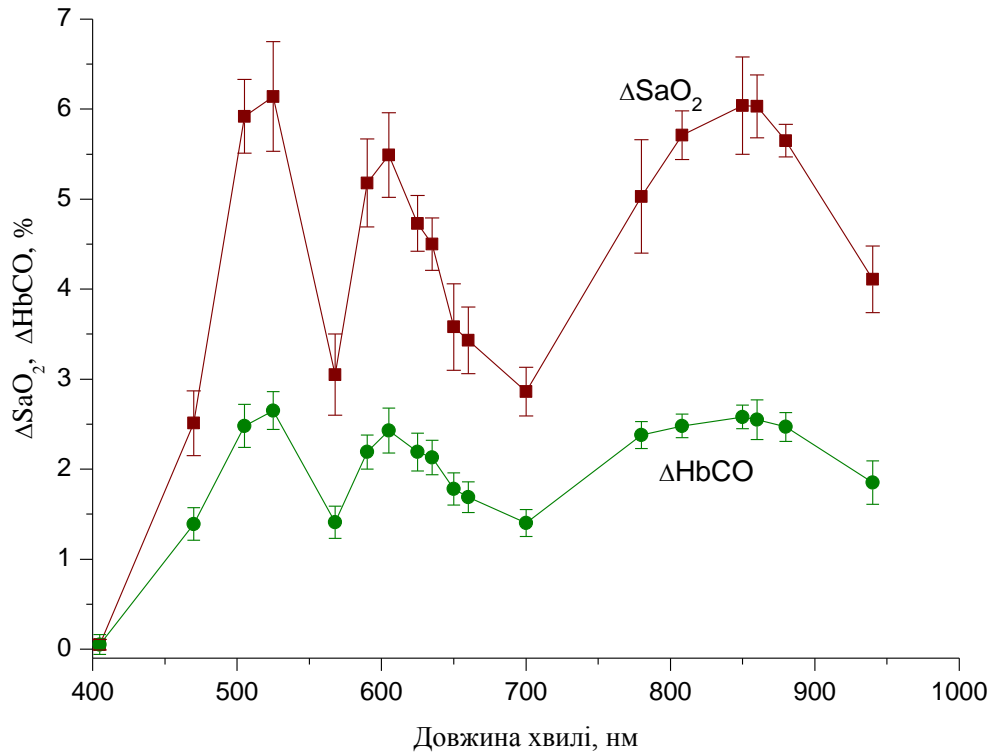


Рисунок 3.36. Абсолютні зміни ΔSaO_2 і $\Delta HbCO$ в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця (спектр впливу).

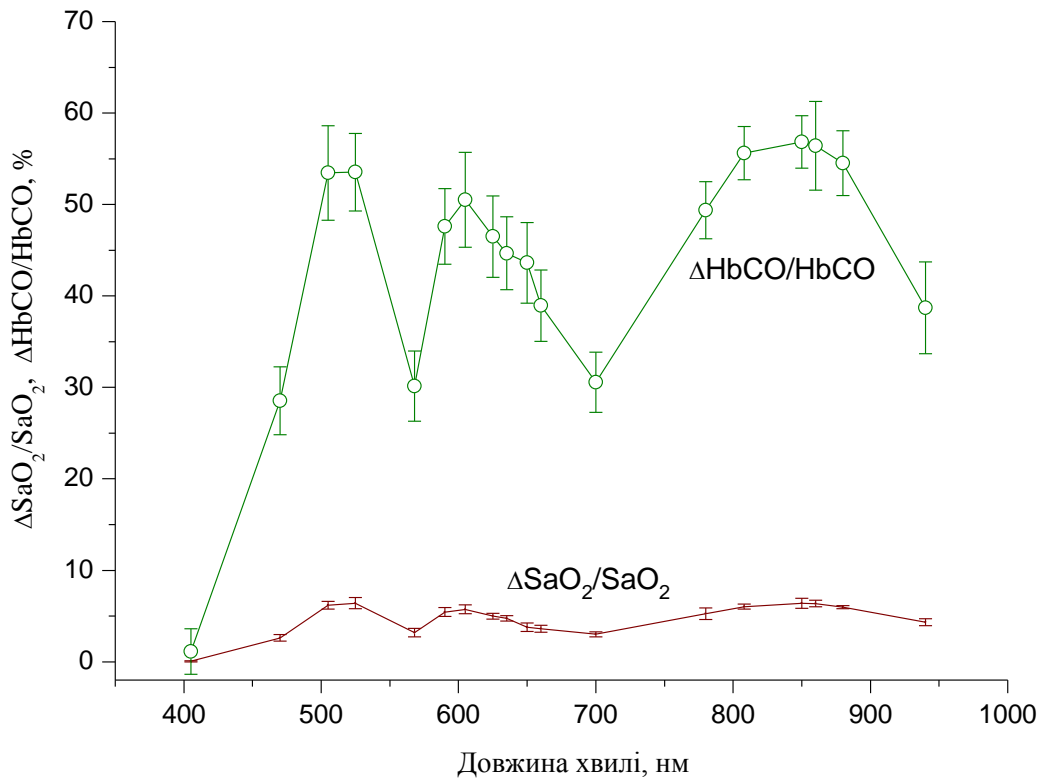


Рисунок 3.37. Відносне зниження SaO_2 і $HbCO$ під час опромінення 1-ї фаланги пальця.

Безпосередньо на спектрі відображаються два максимуми у видимій області спектру (в області 525 і 600 нм) і більш обширний максимум у ближній ІЧ області (850 нм). Найбільше зниження SaO_2 досягає 6,1%, а HbCO – 2,6%. Варто звернути увагу, що пониження SaO_2 відбувається на фоні 95%, а HbCO – на фоні 5%, тобто під фотоліз підпадають ~5% молекул оксигемоглобіну і ~50% молекул карбоксигемоглобіну відповідно. Цей результат дає зрозуміти, що в умовах *in vivo* квантовий вихід фотодисоціації карбоксигемоглобіну являється значно більшим, ніж оксигемоглобіну.

В цілях з'ясувати залежності ефекту змін відносних концентрацій окси- і карбоксигемоглобіну при впливі зовнішнього опромінення від його проникнення вглиб тканини здійснено другу серію експериментальних досліджень, в якій світлодіоди або лазерні діоди було введено всередину трихвильового пульсоксиметричного датчика збоку під певним кутом, щоб було опромінено нижню частину другої фаланги пальця поряд зі стиком з першою фалангою. В даному випадку відстань від джерела до об'єкту опромінення становила 12 мм. Заміри було здійснено на пальцях помірних курців з середнім вмістом HbCO в крові від 4 до 6%.

Зображення характеру змін сигналів датчика і обрахованих SaO_2 і HbCO в процесі випромінювання на другу фалангу пальця представлено на рисунках 3.40, 3.41.

Показники відносних концентрацій окси- і карбоксигемоглобіну до та в процесі опромінення 2-ї фаланги пальця у відповідності з довжиною хвилі зовнішнього джерела як результат статистичного аналізу замірів для всіх джерел наведено на рисунку 3.40.

Діапазон впливу випромінювання на вміст окси- і карбоксигемоглобіну в крові при опроміненні 2-ї фаланги пальця представлено на рисунку 3.41 (абсолютні значення). Відносні значення змін SaO_2 і HbCO – $\Delta\text{SaO}_2/\text{SaO}_2$ і $\Delta\text{HbCO}/\text{HbCO}$ надано на рисунку 3.42.

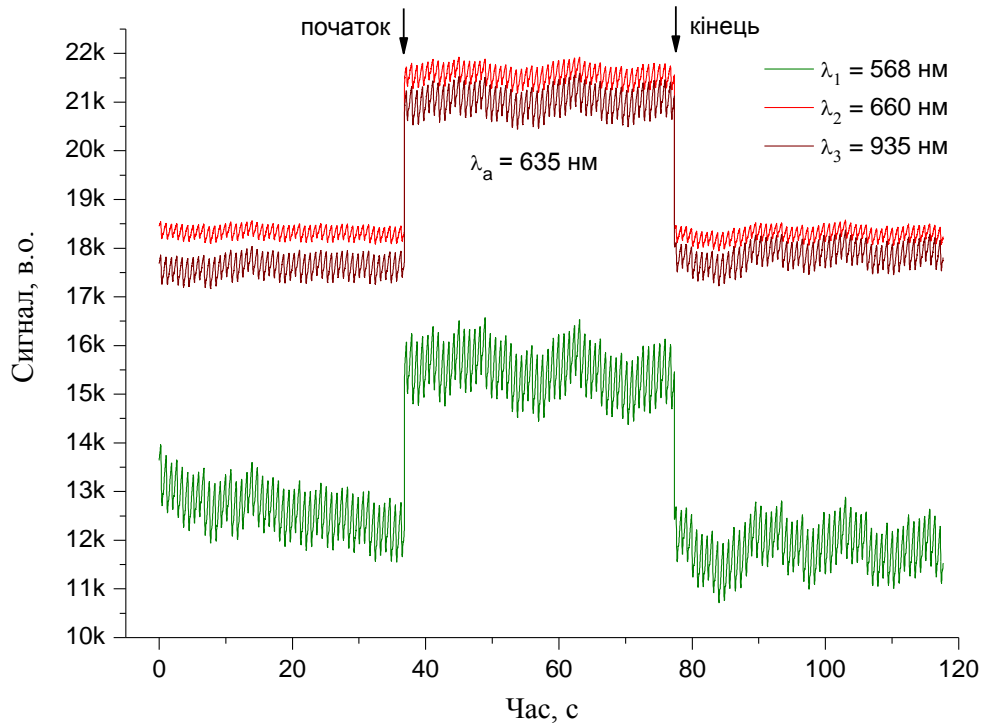


Рисунок 3.38. Фотоплетизмограми, зняті 3-хвильовим датчиком до та в процесі опромінення 2-ї фаланги пальця довжиною хвилі 635 нм.

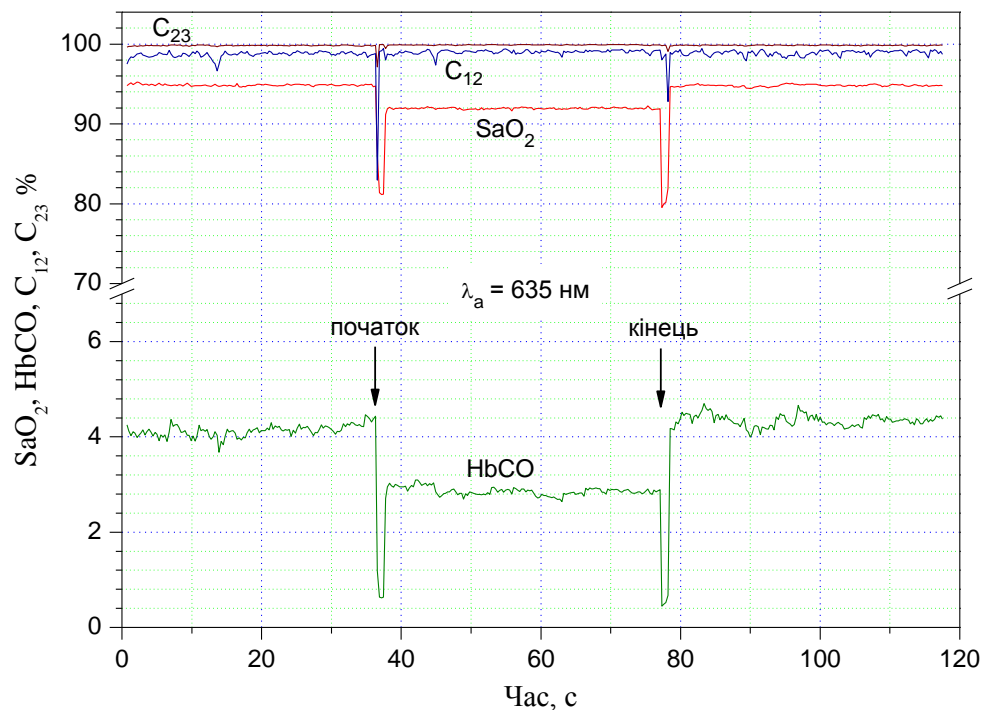


Рисунок 3.39 . Вплив випромінювання LED L-1633SURC-E (635 нм, 15 мВт) на SaO_2 і HbCO . C_{12} і C_{23} – коефіцієнти кореляції сигналів λ_1 (568 нм) і λ_2 (660 нм) та λ_2 і λ_3 (940 нм).

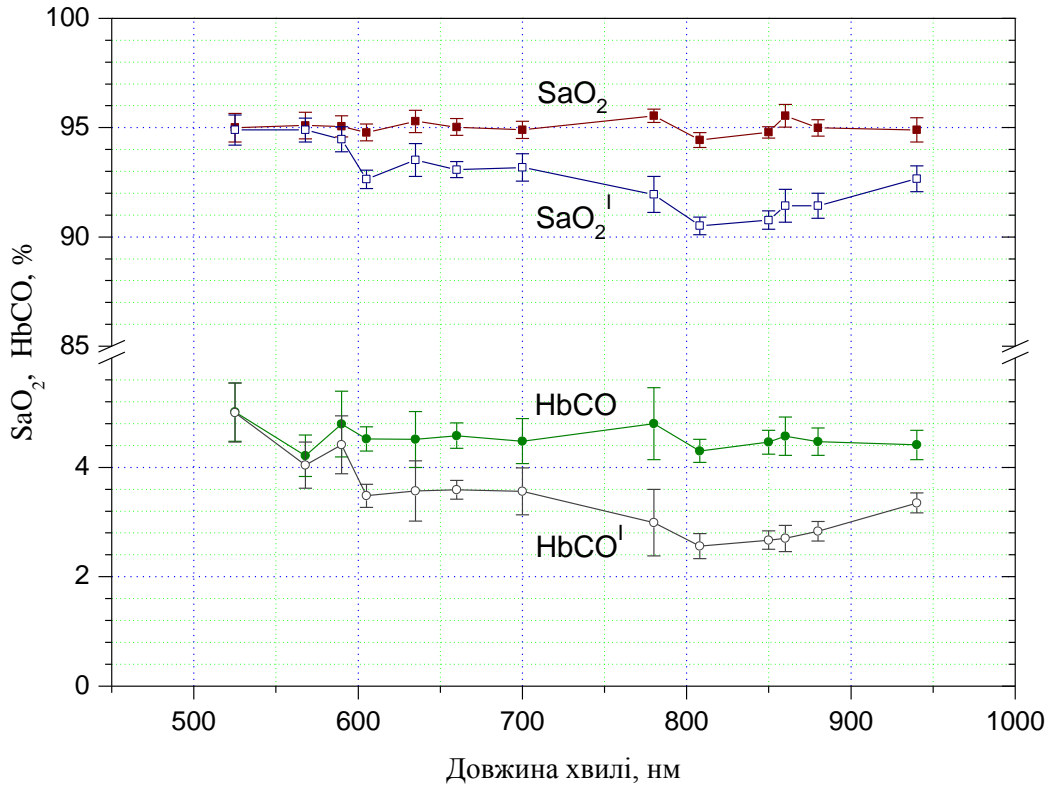


Рисунок 3.40. Середні значення SaO₂ і HbCO до та в процесі опромінення (SaO₂' і HbCO') 2-ї фаланги пальця.

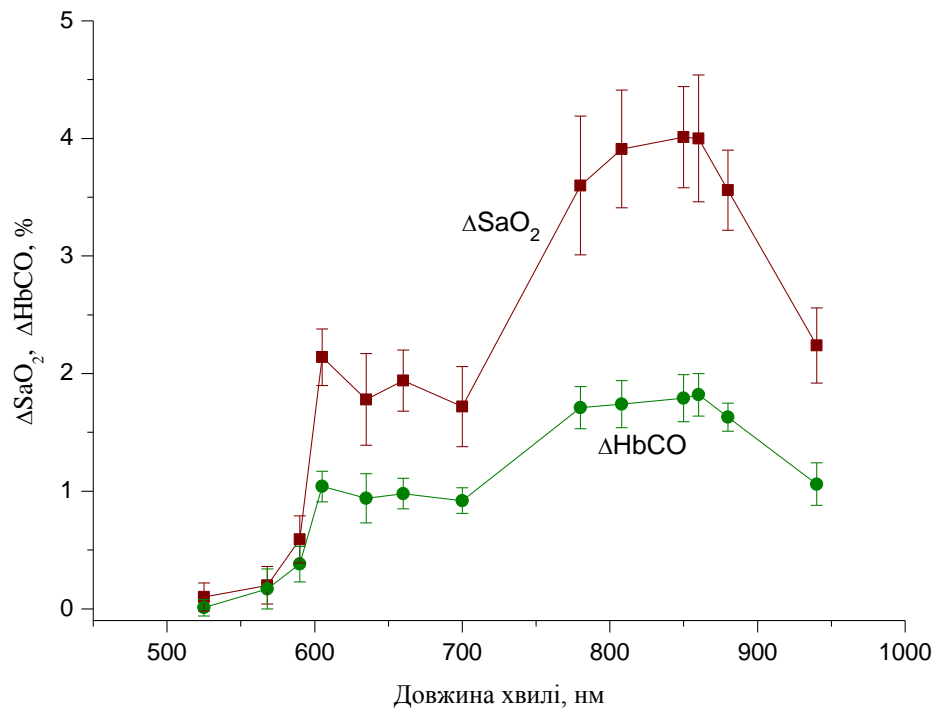


Рисунок 3.41. Абсолютні зміни Δ SaO₂ і Δ HbCO в процесі опромінення 2-ї фаланги пальця.

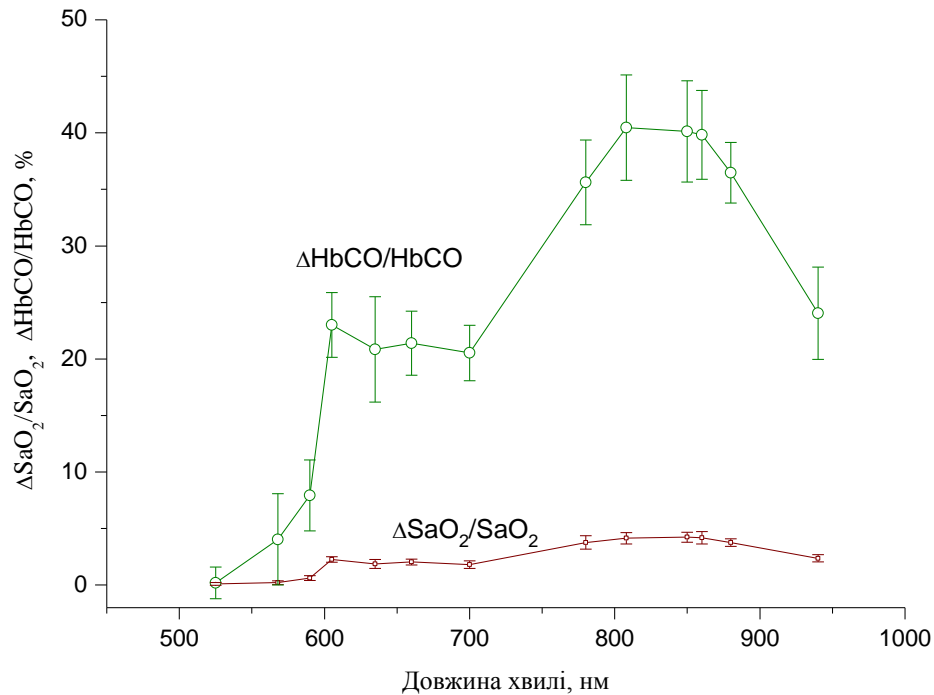


Рисунок 3.42. Відносне зниження SaO_2 і $HbCO$ в процесі опромінення 2-ї фаланги пальця.

Тому з результатів можна дійти висновку, що зі зростанням відстані від джерела випромінювання до фотоприймача пульсоксиметричного датчика, що в нашому випадку зі збільшенням товщі тканини, через яку проходить випромінювання, короткохвильовий максимум в області 520 нм зникає, максимум в області 600 нм знижується та розмивається, і максимальний результат ($\Delta SaO_2 = 4,0$; $\Delta HbCO = 1,8$) спостерігається в області 850 нм.

Один з принципів ефекту фотодисоціації $HbCO$ може бути пояснено виходячи з рисунка 3.42, що покладається на висновки з роботи [50].

3.5. Зміни точності вимірювань сатурації крові за рахунок впливу карбоксигемоглобіну

В необхідності визначення впливу наявного в крові карбоксигемоглобіну на доцільність вимірювання змін сатурації крові здійснювалися 2 серії дослідів з опроміненням 1-ї фаланги і 2-ї фаланги пальця людей що курять після 12-годинної паузи в курінні, коли середнє значення $HbCO$ складало 2,4-2,6%. Результати надані в рисунках 3.43-3.44.

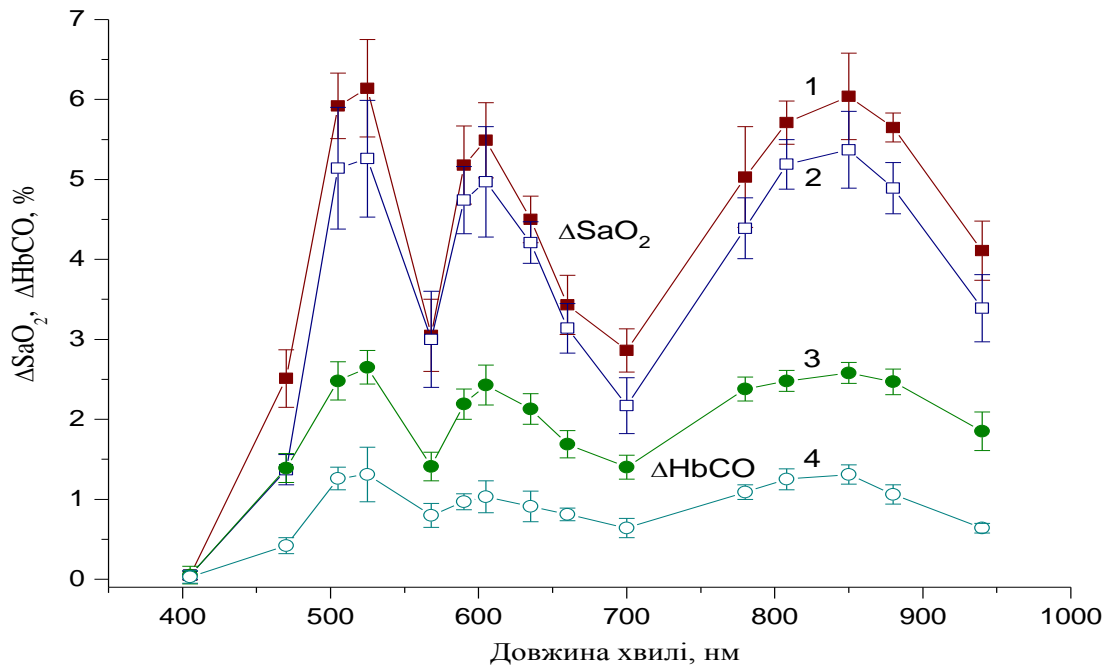


Рисунок 3.43. Результат впливу рівня HbCO на зміни визначуваної сатурації в процесі опромінення 1-ї фаланги пальця. 1 і 3 – ΔSaO_2 і ΔHbCO при середньому початковому значенні HbCO 4,6%; 2 і 4 – ΔSaO_2 і ΔHbCO при середньому початковому значенні HbCO 2,4%.

В ході опромінення 1-ї фаланги пальця різними довжинами хвиль зниження базового рівня HbCO з 4,6 до 2,4% спостерігається у зменшенні вимірюваних приладом змін сатурації ΔSaO_2 на величину від 0 до 1,53. Середні початкові рівні SaO_2 відображали 95,1% та 94,6% відповідно.

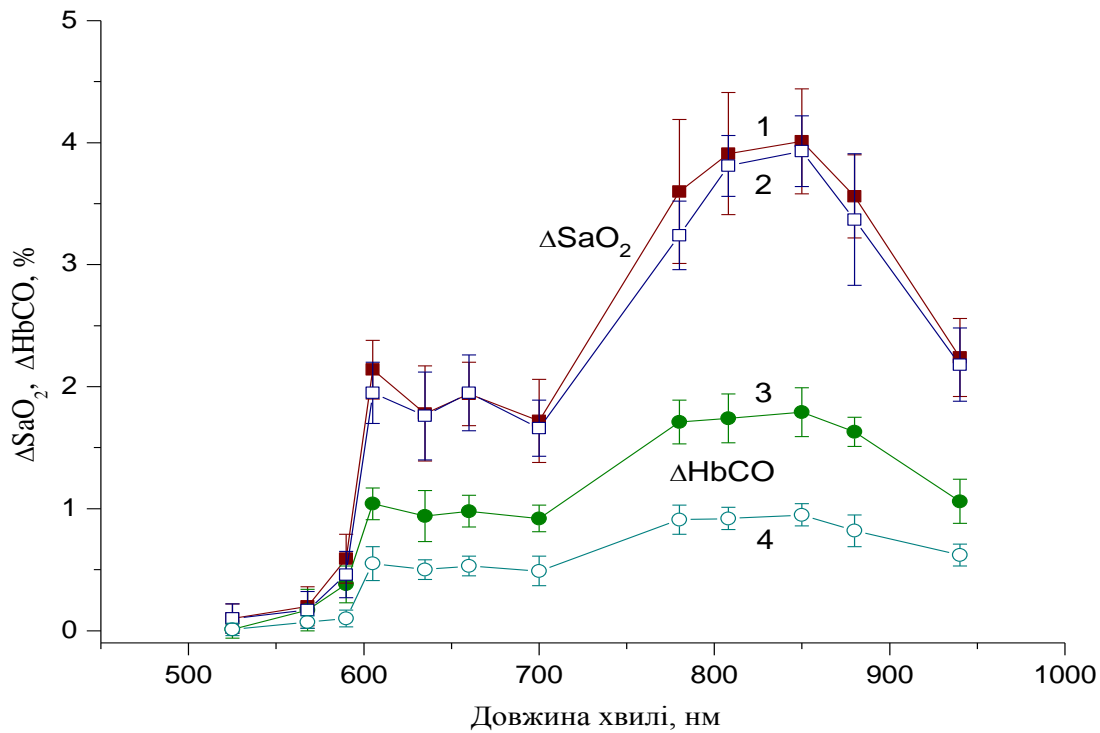


Рисунок 3.44. Результат впливу рівня HbCO на зміни визначуваної сатурації в процесі опромінення 2-ї фаланги пальця. 1 і 3 – ΔSaO_2 і $\Delta HbCO$ при середньому початковому значенні HbCO 4,5%; 2 і 4 – ΔSaO_2 і $\Delta HbCO$ при середньому початковому значенні HbCO 2,6%.

В ході опромінення 2-ї фаланги пальця різними довжинами хвиль зниження базового рівня HbCO з 4,5 до 2,6% проявляється у зменшенні вимірюваних приладом змін сатурації ΔSaO_2 на величину від 0 до 0,36%. Середні початкові рівні SaO_2 складали 95,0% та 93,5% відповідно.

Це означає що при визначенні сатурації і її змін при впливі різних чинників необхідно враховувати похибку, яка стає умісною через наявний в крові карбоксигемоглобін. Дані та безпосередньо сила впливу рівня HbCO в крові на доцільність пульсоксиметричних вимірювань сатурації за висновками різних авторів досить розбіжні [64,65], тому дане питання потребує подальших досліджень. Занчущим результатом роботи є факт, що була визначена спектральна залежність ефекту фотолізу оксигемоглобіну при мінімальному спотворенні через карбоксигемоглобін.

Всі дані що були визначені в ході чисельних і експериментальних досліджень є фундаментальною базою для організації проведення клінічних

випробувань новітніх методик та способів детоксикації при отруєнні чадним газом шляхом його фотодисоціації в кровоносних судинах *invivo*.

У відповідності зі ступенем важкості отруєння, що визначається вмістом HbCO в крові, є доцільним пропонувати щонайменше двох варіантів реалізації опромінення крові. Для випадків з концентраціями карбоксигемоглобіну від 10% до 20% змістовним є використати опромінення через шкірний покрив із застосуванням довжин хвиль в області від 600 до 950 нм.

Для окремих випадків коли концентрація карбоксигемоглобіну в крові є на небезпечно критичному рівні, тобто призводить до відчутного зниження киснево-транспортних властивостей гемоглобіну а також важкої гіпоксії, постає необхідність в інтенсивній фотодеструкції HbCO у венозній крові, за рахунок внутрішньовенного опромінення із застосуванням джерел в спектральній області 500-530 нм і 590-620 нм. В ході даної процедури венозна кров проходячи через легені, знову насичується киснем, і через артеріальний кровотік відновлює адекватне постачання кисню в тканини. Значущим фактором у збільшенні ефективності представлених методів є підтримка найвищої можливої концентрації молекулярного кисню в плазмі крові. В даному випадку при фотодеструкції карбоксигемоглобіну стається заміщення СО безпосередньо молекулярним киснем а отже знижується рівень толерантності та шанс повторного зв'язування чадного газу з гемоглобіном.

Описаний принцип детоксикації отруєння чадним газом шляхом фотолізу карбоксигемоглобіну і відповідне обладнання для його реалізації є доцільним для потенційного використання в сучасній медицині і стане в нагоді як людям з дихальною недостатністю спричиненою регулярним палінням а також для ліквідації отруєнь чадним газом при пожежах та техногенних катастрофах.

4. РОЗРОБКА СТАРТАП ПРОЕКТУ

4.1 Резюме

Бізнес ідея: створення пристрою пульсоксиметричного типу для вимірювання концентрації карбоксигемоглобіну *in vivo* та при використанні лазерного опромінення для корекції та профілактики наслідків куріння та отруєння чадним газом.

Мета наукової розробки: вимірювання концентрації та використання лазерної стимуляції для фотодисоціації карбоксигемоглобіну при палінні та отруєнні чадним газом.

Назва розробки: «Визначення впливу лазерного випромінювання для фотодисоціації карбоксигемоглобіну при курінні»

Суб'єкт замовлення: Інститут прикладних проблем фізики та біофізики НАН України

Об'єкт дослідження: сполуки гемоглобіну людини, зокрема окси- та карбоксигемоглобін.

Місце розробки в інноваційному ланцюжку цінності: дана ідея знаходиться на етапі розробки, оскільки проводяться дослідження впливу лазерного опромінення на всі біологічні системи.

Продукт наукової розробки: пульсоксиметри, що здатні вимірювати концентрацію та за рахунок дії лазерного випромінювання впливати на комплекси карбоксигемоглобіну та спричинювати їх фотодисоціацію.

Технологія: опромінення ділянок шкіри певними довжинами хвиль лазерного випромінювання з попереднім та подальшим заміром концентрації карбоксигемоглобіну до та після процедури.

Доступність сировинної бази: дані вимірювання сатурації та концентрації карбоксигемоглобіну до та після опромінення були отримані за рахунок залучення волонтерів курців та некурців на базі Інституту прикладних проблем фізики та біофізики НАН України.

Кваліфікація персоналу:

1. Провідний спеціаліст – повна вища освіта; досвід роботи в проведенні пульсоксиметрії та фотодисоціації комплексів карбоксигемоглобіну, стаж роботи – не менше 6-х років.
2. Науковий керівник – повна вища освіта, професор кафедри Біоінформатики; досвід роботи в проведенні моніторингових досліджень впливу лазерного опромінювання на живі системи *in vivo*.

Ринок збуту: медичні установи

Вартість розробки: 889 193 грн.

4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища підприємства

4.2.1 Загрози і можливості зовнішнього середовища

Таблиця 4.1 – Оцінка загроз і можливостей зовнішнього середовища

Загрози	Можливості
Політика	
<ul style="list-style-type: none"> - Зменшення державного фінансування освіти; - Політична нестабільність в країні; - Відсутність підтримки розвитку наукових досліджень. 	<ul style="list-style-type: none"> - Пошук закордонних інвесторів - Співпраця з іноземними компаніями та поширення ідеї; - Співпраця із закордонними інститутами.
Економіка	
<ul style="list-style-type: none"> - Зміна курсу гривні (інфляція); - Нестабільний курс валют; - Зниження рівня зайнятості населення. 	<ul style="list-style-type: none"> - Можливість взяти довгостроковий кредит; - Зменшення кількості конкурентів; - Можливість наймати достатню кількість кваліфікованих кадрів.
Географія	
<ul style="list-style-type: none"> - Зміна клімату - Негативна екологічна ситуація; 	<ul style="list-style-type: none"> - Широке поле ідей для нових досліджень;

- Побудова нових автомагістралей та промислових підприємств.	- Підвищення необхідності в даних наукових дослідженнях
Демографія	
- Скорочення робочих місць і безробіття; підвищення вартості життя в місті;	- Продовження навчання на бюджетній формі, зацікавленість населення в НДР, можливості міжнародного обміну між студентами;
Культура	
- Міграція молоді закордон.	- Впровадження нових технологій
Науково – технічний прогрес	
- Популяризація збільшення кількості розробок і досліджень у сфері взаємозв'язку біосистем та геофізичних факторів; - Низький рівень науково технічного прогресу в Україні та відсутність сприяння їм з боку держави	- Залучення нових фахівців - Можливість виходу на міжнародний ринок.

4.2.2 Переваги та недоліки внутрішнього середовища

Таблиця 4.2 – Оцінка переваг та недоліків внутрішнього середовища

Переваги	Недоліки
Постачальники	
- Наявність постачальників сировини і матеріалів в Україні; - Швидка та недорога доставка товару.	- Невчасне постачання товару; - Можливість пошкодження при транспортуванні.
Виробництво	
- Можливість використовувати приміщення, надані замовником для проведення НДР; - Зменшення витрат на	- Необхідність в постачальнику пульсокриметрів та лазерних діодів певної інтенсивності та спектру випромінювання

заробітню плату; - Низька чисельність персоналу; - Часткова зайнятість персоналу; - Витрати на транспорт бере на себе замовник.	- Потреба в дорогому обладнанні для промислового виробництва пульсоксиметрів з лазерними діодами, що будуть здатні спричинювати дисоціацію карбоксигемоглобіну.
Споживачі	
- Зацікавленість споживачів у використанні результатів НДР; - Безпечність розробки для споживачів.	- Незручності у зміні параметрів виробництва.
Посередники	
- Посередником є замовник, який бере на себе транспортні витрати	- Залежність від замовника.
Конкуренти	
- Відсутність схожих НДР – відсутність прямих конкурентів.	- Неможливість співпраці з іншими науковими установами

4.2.3 Місце розробки у системі цінностей підприємства методом Бостонської матриці

Так як дана НДР є унікальною і не має аналогів в Україні, то продукт (результати НДР) відразу займає позицію «Зірки» .

4.2.4 Аналіз потенційного ринку збуту і конкуренції середовища за методом квадрату Бове

Дослідження визначення концентрації карбоксигемоглобіну в крові людина та подальшого впливу лазерного випромінювання для фотодисоції карбоксигемоглобіну може дати важливі результати для людей що страждають від наслідків куріння та отруєння чадним газом.

Єдиною науковою установою, що займається даними питаннями в Україні є Інститут прикладних проблем фізики та біофізики НАН України.

Можливості збуту результатів НДР практично безкінечні, адже їх можна використовувати в якості датчика відносної концентрації карбоксигемоглобіну в крові людини та потенційного методу лікування наслідків куріння та отруєння чадним газом.

4.3 Ключові фактори успіху

Оскільки як ідея так і сам продукт є унікальними та технологія що запланована для використання в даному продукту ні тепер ні раніше не була застосована то продукт є конкурентноспроможним оскільки є єдиним в своєму напрямку.

4.4.2 Джерела фінансування НДР

Основними джерелами фінансування даної НДР є кошти Інституту прикладних проблем фізики та біофізики НАН України, та кошти кафедри біоінформатики НТУУ «КПІ ім. Ігоря Сікорського» що складає 80% і 20% інвестицій.

Інвестиції будуть надходити у поточній формі.

4.4.3 Розрахунок пропозиції

Основні фонди підприємства

Згідно Податкового кодексу термін експлуатації наступних основних фондів та амортизаційні відрахування наведено в таблиці 4.3.

Будівлі надано замовником в оренду безкоштовно; замовник бере на себе транспортні витрати.

Таблиця 4.3 – Вартість основних фондів

№	Найменування	Кількість, шт	Вартість, грн	Норма амортизації, %	Амортизаційні відрахування, грн
1	Будівлі (кабінет та виробничі приміщення)	2	120000	20	24000
2	Обладнання для виробництва	1	50000	20	10000
4	Офісне обладнання (телефон, принтер, комп'ютер)	3	30 000	20	6 000
5	Канцелярське приладдя	50	5 000	5	250
6	Виробничий інвентар	50	5 000	6	300
7	Транспорт		0	5	0
	Загальна вартість		210 000		40 550

Оборотні фонди підприємства

1. Вартість матеріалів:

В якості матеріалів будуть використовуватися пульсоксиметри по ціні 600 грн за шт. і будуть закуплені в кількості 400 шт. та світлодіоди в кількості 400 шт за ціною 37 грн за штуку.

№	Найменування	К-сть. шт	Ціна за шт. грн	Сум.ціна грн
1	Пульсоксиметри	400	600	240000
2	Світлодіоди	400	37	14800
	Загальна вартість			254800

2. Пакування в картонні коробки, попередньо заповнені пухирчатою плівкою. 400 коробок по 1 грн за штуку та 150 м² пухирчатої плівки за ціною 10 грн за м²:

№	Найменування	К-сть. шт	Ціна за шт. грн	Сум.ціна грн
1	Коробки картонні	400	1	400
2	Пухирчата плівка	150	10	1500
	Загальна вартість			1900

3. Витрати на електроенергію: розрахунок витрат на електроенергію буде проведено після вибору специфічного обладнання за результатами досліджень та встановлення його потужності. Да даний момент орієнтовна ціна на електроенергію буде складати:

	Час роботи, год	Час роботи протягом 5 років, год
Комп'ютер	2	3 650
Принтер	2	3 650
Всього		7300

$$E = (1.3 + 1.12 + 2) \cdot 3 \cdot 7300 = 32\,266 \text{ грн.}$$

4. Витрати на ФОП:

$$\text{ФОП} = \text{ЗП} + \text{Нарахування.}$$

ЗП працівників наведена в таблиці 4.5.

Таблиця 4.5 – Заробітна плата працівників.

Посада	ЗП грн., за місяць	Час роботи за рік, міс	ЗП грн., за рік	ЗП грн., за 5 років
Провідний спеціаліст	5 000	12	48000	240000
Науковий керівник	5 000	12	48000	240000
Сумарно				480 000

$$\text{ФОП} = 480000 \cdot 1,22 = 585\,600 \text{ грн,}$$

де 1,22 – це нарахування на заробітну плату в розмірі 22 %.

Вартість оборотних засобів наведена в таблиці 4.6.

Таблиця 4.6 – Оборотні засоби підприємства.

№	Оборотні засоби	Ціна, грн/рік
1	Матеріали	256 700
2	Витрати на електроенергію	6 453
4	ФОП	585 600
Загальна вартість		848 643

Калькуляція на проведення НДР наведена в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7 – Калькуляція на проведення НДР

№	Статті калькуляції	Сума, грн.
1.	Заробітна плата	480 000
2.	Нарахування на заробітну плату	105 600
3.	Матеріали	256 700
4.	Витрати на електроенергію	6 453
5.	Амортизація	40 550
Всього		848 753

Розрахунок собівартості НДР

Собівартість НДР:

$$C = Обз + А = 848\,643 + 40\,550 = 889\,193 \text{ грн.}$$

4.5 Ризики і страхування

Ступінь впливу на дохід підприємства та ймовірність настання ризиків (100 – обов’язково станеться; 10 – ризик можливий, але малоімовірний) наведено в таблиці 4.8

Таблиця 4.8 – Оцінка можливих ризиків.

Ризик	Коефіцієнт впливу на дохід	Експертна оцінка настання ризику
Комерційні ризики		
Розробка нових технологій	0,8	20
Відсутність споживчого попиту на продукт	0,97	80
Організаційні ризики		
Складність із забезпеченням робочої групи кадрами необхідної кваліфікації	0,75	30
Проблеми своєчасного постачання матеріально-технічних ресурсів	0,9	50
Проблеми з організацією збутової мережі	0,95	70
Технічні ризики		
Необхідність дообрацювання в процесі виробництва технології виготовлення продукції	0,85	10
Рекламації на продану продукцію з причини неякісного комплектування	0,7	20
Фінансові ризики		
Інфляція	0,75	30
Ризик неплатоспроможності споживачів	0,75	30

З метою страхування від настання ризикових подій передбачено застосування таких дій, що дають змогу мінімізувати ризики.

1. Проведення маркетингових досліджень та перевірка потреб споживача.
2. Залучення зовнішніх спеціалістів з тих областей, де ризик найбільш імовірний.
3. Прийом на роботу лише висококваліфікованих та дисциплінованих працівників, які мають хороші рекомендації.
4. Обговорення у договорах з постачальниками сировини і матеріалів порядку відшкодування збитків, заподіяних несвоєчасною поставкою сировини. Створення резервного запасу сировини та матеріалів на підприємстві.
5. Співробітництво з високотехнічними виробниками та іноземними виробниками.
6. Орієнтація на визначену категорію споживачів та на постійних клієнтів.
7. Підтримка науково-дослідних установ, які займаються розробкою новинок у даній галузі.
8. Страхування майна.
9. Прогнозування можливих ризиків.

Щодо страхування, на підприємстві планується здійснити такі види страхування:

1. Страхування власного виробництва від впливу різних несприятливих факторів (пожежа, відключення електроенергії і ін.)
2. Соціальні страхування співробітників підприємства.

ВИСНОВКИ

1. Проведені дослідження на курцях та некурцях волонтерах показали достовірну різницю між відношеннями коефіцієнтів модуляції сигналів зеленого, червоного та ІЧ каналів у некурців ($R_{12} = 2,75 \pm 1,11$) та курців ($R_{12} = 6,03 \pm 1,69$); з відповідними значеннями вмісту карбоксигемоглобіну в крові ($1,6 \pm 0,9\%$ і $4,4 \pm 1,4\%$).

2. Пікові концентрації НbСО впродовж процесу паління досягають 6-8 %, а після паління падають до певного фонового рівня, що перевищує початковий на 0,5-2,5% в залежності від кількості викурених до цього сигарет та особливостей функціонального стану організму.

3. В поверхневих шарах шкіри (до 5 мм) ефект падіння концентрацій НbO₂ і НbСО максимальний при опроміненні в зеленій області спектру (525 нм), а падіння SaO₂ досягає 5% і НbСО – 2,5% при початкових рівня 95% і 5% відповідно.

4. У випадку помірних концентрацій карбоксигемоглобіну від 10% до 20% доцільним є опромінення через шкірний покрив з використанням довжин хвиль в області від 600 до 950 нм, що буде використано при подальших дослідженнях детоксикації при отруєнні чадним газом шляхом її фотолізу в кровоносних судинах *in vivo*.

5. Розроблено стартап проект створення пристрою пульсоксиметричного типу для вимірювання концентрації карбоксигемоглобіну *in vivo* та при використанні лазерного опромінення для корекції та профілактики наслідків куріння та отруєння чадним газом.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. [C. Lockard Conley](#). Blood./ [C. Lockard Conley](#), [Robert S. Schwartz](#) // J. BIOCHEMISTRY. – 2005. – vol. 22. – p. 45-47.
2. Egan W.J. Measurement of Carboxyhemoglobin in Forensic Blood Samples Using UV-Visible Spectrometry and Improved Principal Component Regression / Egan W.J., Brewer W.E., Morgan S.L. //Appl. Spectroscopy.– V.53.– 1999.– P.218–225.
3. Блюменфельд Л.А. Гемоглобин//Химия. Соросовский образовательный журнал.– №4.– 1998.– С.33–38.
4. Sjostrand T. Endogenous formation of carbon monoxide in man under normal and pathological conditions// Scand J Clin Invest. – 2010.- vol. 722. P. 201-206.
5. [Douglas J.Weiss](#). Erythrocyte Disorders/[J.Weiss](#) Douglas, [Harold Tvedten](#) //Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods – vol. 5. – 2012. – p. 38-62.
6. Myburgh JA. Derived oxygen saturations are not clinically useful for the calculation of oxygen consumption// Anaesth Intensive Care. – 2002. –vol. 20. – p. 460-463.
7. Marc D. Berg. Gas Exchange and Acid-Base Physiology Gas Exchange, Oxygen Delivery, and Ventilation/ Marc D. Berg, Robyn J. Meyer. – 2008. – p. 179-182.
8. [Castro C.E](#). Conversion of oxyhemoglobin to methemoglobin by organic and inorganic reductants./ [C.E](#). Castro, R.S. Wade, N.O. Belser.// Biochemistry. – 1978. – vol. 17, p. 225-231
9. Blumenfeld L.A. Physics of Bioenergetic Processes. N.Y.: Springer-Verlag, 1983.
10. McQueen C.A. Functional anemia// J. Comprehensive Toxicology. – 2017. – vol. 3 – p. 153-157.
11. Curry S. Methemoglobinemia/ P.Rosen, R. Barkin, DF Denzl et al. //Emergency Medicine: Concepts and Clinical Practice. – 1997. – vol. 4. – p. 285-287.
12. Benz EJ Jr. Hemoglobin Variants Accosiated with Hemolytic Anemia, Altered Oxygen Affinity, and Methemoglobinemias// Nature. – 1996. – v.125. – p. 223-225.

13. Coburn RF. Effect of erythrocyte destruction on carbon monoxide production in man/ R.F. Coburn, W.J. Williams, R.E. Forster// J Clin Invest. – 2001. – vol. 143. – p. 1098-1103.
14. Fairbanks V.F. Biochemical aspects of hematology / V.F. Fairbanks, G.G. Klee// Tietz textbook of clinical chemistry.– Philadelphia: WB Saundersю – 1999. – P.642–710.
15. Haymond S., Cariappa R., Eby C.S., Scott M.G. Laboratory Assessment of Oxygenation in Methemoglobinemia // Clinical Chemistry.– V.51:2.– 2005.– P.434–444.
16. Fairbanks V.F., Klee G.G. Biochemical aspects of hematology / Tietz textbook of clinical chemistry.– Philadelphia: WB Saunders, 1999.– P.642–710.
17. Ленинджер А. Основы биохимии. М.: Мир, 1985.
18. Harper A. Carbon monoxide poisoning: undetected by both patients and their doctors. Age and Ageing// Clinical Chemistry.– V.33– 2004. – p. 105-09.
19. Aviado DM. [Carbon monoxide as an index of environmental tobacco smoke exposure](#) // Eur J Respir Dis Suppl. 1984;133:47-60. Review.
20. Fierro M. Carbon monoxide (CO) / Air Updates. Health professional pages.– 2001.– P.1-11
21. Von Burg R. Toxicology Update // J. Appl. Toxicology.– V.19.– 1999.– P.379–386.
22. Vreman H.J., Mahoney, Stevenson D.K. Carbon monoxide and carboxyhemoglobin // Adv. Pediatrics.– V.42.– 1995.– P.303–334.
23. Maynard R.L., Waller R. Carbon Monoxide / Air Pollution and Health.– Eds. Holgate S.T., Samet J.M., Koren H.S., Maynard R.L.– Academic Press: Brace & Co. Publishers, 1999.– P.749–796.
24. Шулагин Ю.А., Степанов Е.В., Чучалин А.Г., Бабарсков Е.В., Дьяченко А.И., Павлов Б.Н. Лазерный анализ эндогенного СО в выдыхаемом воздухе // Труды Института общей физики им. А.М. Прохорова.– Т. 61.– 2005.– С.135–189.

- 25.Марков Х.М. Окись азота и окись углерода – новый класс сигнальных молекул // Успехи физиологических наук.– Т.27.– 1996.– С.30–41.
- 26.World Health Organization 1999. Carbon Monoxide. Environmental Health Criteria 213 / Geneva: World Health Organization. – 1999.
- 27.Adir Y., Merdler A., Ben Haim S., Front A., Harduf R., Bitterman H. Effects of exposure to low concentrations of carbon monoxide on exercise performance and myocardial perfusion in young healthy men // Occup. Environm. Med.– V.56.– 1999.– P.535–538.
- 28.Haymond S., Cariappa R., Eby C.S., Scott M.G. Laboratory assessment of oxygenation in methemoglobinemia // Clinical Chemistry.– V.51:2.– 2005.– P.434–444.
- 29.National Committee for Clinical Laboratory Standards. Fractional oxygen content and saturation, and related quantities in blood: terminology, measurement, and reporting; approved guideline C25-A [Report]. Wayne, PA: NCCLS, 1997.
- 30.Scott M.G., Heusel J.W., LeGrys V.A., Sigaard-Anderson O. Electrolytes and blood gases [blood gases and pH] / Tietz textbook of clinical chemistry. Eds. Burtis C.A., Ashwood E.R.– Philadelphia: WB Saunders, 1999.
- 31.Barker S.J., Tremper K.K. The effect of carbon monoxide inhalation on pulse oximetry and transcutaneous PO₂ // Anesthesiology.– V.66.– 1987.– P.677–679.
- 32.Buckley R.G., Aks S.E., Eshom J.L. et al. The pulse oximetry gap in carbon monoxide intoxication // Ann. Emerg. Med.– V.24.– 1994.– P.252–255.
- 33.Wright R.O. Pulse oximetry gap in carbon monoxide poisoning // Ann. Emerg. Med.– V.31.– 1998.– P.525–526.
- 34.Scott M.G., Heusel J.W., LeGrys V.A., Sigaard-Anderson O. Electrolytes and blood gases [blood gases and pH] / Tietz textbook of clinical chemistry. Eds. Burtis C.A., Ashwood E.R.– Philadelphia: WB Saunders, 1999.
- 35.Costantino A.G., Park J., Caplan Y.H. Carbon monoxide analysis: a comparison of two CO-oximeters and headspace gas chromatography // J. Anal. Toxicol.– V.10.– 1986.– P.190–193.

36. Johansson M.B., Wollmer P. Measurement of carboxyhemoglobin by spectrophotometry and gas chromatography // *Clin. Phys.*— V.9.— 1989.— P.581–586.
37. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Definitions of quantities and conventions related to blood pH and gas analysis; approved standard C12-5 [Report]. Wayne, PA: NCCLS, 1994.
38. Mahoney J.J., Vreman H.J., Stevenson D.K., Van Kessel A.L. Measurement of carboxyhemoglobin and total hemoglobin by five specialized spectrophotometers (CO-oximeters) in comparison with reference methods // *Clin. Chem.*— V.39.— 1993.— P.1693–1700.
39. Vreman H.J., Ronquillo R.B., Ariagno R.L., Schwartz H.C., Stevenson D.K. Interference of fetal hemoglobin with the spectrophotometric measurement of carboxyhemoglobin // *Clin. Chem.*— V.34.— 1988.— P.975–977.
40. Steinke J.M., Shepherd A.P. Effects of temperature on optical absorbance spectra of oxy-, carboxy-, and deoxyhemoglobin // *Clin. Chem.*— V.38.— 1992.— P.1360–1364.
41. Koch M.J., Casucci G.M., Koch D.D. Evaluation of the Corning 2500 CO-oximeter [Abstract] // *Clin. Chem.*— V.31.— 1985.— P.921.
42. Potter W.T., Hazzard J.H., Choc M.G., Tucker M.P., Caughey W.S. Infrared spectra of carbonyl hemoglobins: characterization of dynamic heme pocket conformers // *Biochemistry.*— V.29.— 1990.— P.6283–6295.
43. Vreman H.J., Mahoney J.J., Van Kessel A.L., Stevenson D.K. Carboxyhemoglobin as measured by gas chromatography and with the IL 282 and IL 482 CO-Oximeters // *Clin. Chem.*— V.34.— 1988.— P.2562–2566.
44. Zijlstra W.G., Buursma A., Meeuwssen-van der Roest W.P. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin // *Clin. Chem.*— V. 37/9.— 1991.— P.1633–1638.
45. Zijlstra W.G., Buursma A., van Assendelft O.W. Visible and near infrared absorption spectra of human and animal haemoglobin / VSP: Utrecht.— ISBN 90-6764-317-3.— 2000.

46. Патент України № 31291А. Мінов О.М., Кравченко В.Й., Плаксі́й Ю.С., Мамі́лов С.О.. Спосіб визначення сатурації крові киснем. – 2000, бюл. №7/2000.
47. Патент України № 89354 . Мамі́лов С.О., Плаксі́й Ю.С., Єсьман С.С. Спосіб визначення відносної концентрації карбоксигемоглобіну в артеріальній крові. – 2010, бюл. №2/2010.
48. Light A., Grass C., Pursley D., Krause J. Carboxyhemoglobin levels in smokers vs non-smokers in a smoking environment// *Respiratory Care*.– 2007.– Open Forum Abstracts.
49. Патент України № 31291А. Мінов О.М., Кравченко В.Й., Плаксі́й Ю.С., Мамі́лов С.О.. Спосіб визначення сатурації крові киснем. – 2000, бюл. №7/2000.
50. Dunietz B.D. Initial step of the photodissociation of the CO ligated heme group/ B.D.Dunietz, A.Drew, M.Head- Gordon // *J. Phys. Chem. B*.– 2003.– V. 107.– P 5623-5629.
51. Franzen S., Kiger L., Poyart C. Heme Photolysis Occurs by Ultrafast Excited State Metal to ring Charge Transfer // *Biophysical Journal*.– 2001.- V.80.– P.2327-2385.
52. Rovira C. The structure and dynamics of the Fe-CO bond in myoglobin/ C.Rovira // *J. Phys.: Condens. Matter*. - 2003. - V. 15. - P. 1809-1822.
53. Dunietz B.D. Initial step of the photodissociation of the CO ligated heme group/ B.D.Dunietz, A.Drew, M.Head- Gordon // *J. Phys. Chem. B*.– 2003.– V. 107.– P 5623-5629.
54. Kuzmin V.V. Study of carboxyhemoglobin photodissociation with laser flash-fotolysis/ V.V.Kuzmin, V.V.Salmin, A.B.Salmina // *Proc. SPIE*. - 2004. - V. 5474. - P. 88-95.
55. Hartmann H., S. Zinser S., Komninos P., Schneider R.T., Nienhaus G.U., Parak F. X-ray structure determination of a metastable state of carbonmonoxy myoglobin after photodissociation // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biophysics*.– V.93, pp.7013-7016.– 1996.

56. Асимов М.М., Асимов Р.М., Рубинов А.Н., Мамилов С.А., Плаксий Ю.С., Есьман С.С. Лазерно-индуцированная оксигенация тканей и стимулирование аэробного метаболизма клеток. Препринт №746 Института физики им. Б.И. Степанова НАН Беларуси.– Минск, 2008.– 34 с.
57. Antonini E., Brunori M. Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands / North Holland, Amsterdam, 1971, 436 pp.
58. Greene B.I., Hochstrasser R.M., Weisman R.B., Eaton W.A. Spectroscopic studies of oxy- and carbonmonoxyhemoglobin after pulsed optical excitation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA V.75(11) (1978) p.5255-5259.
59. Mills F.C., Ackers G.K., Gaud H.T., Gill S.J. Thermodynamics studies on ligand binding and subunit association of human hemoglobins. J. Biol. Chem. 1979. 254:2875–2880.
60. Aldrich T.K. Non-invasive carboxyhemoglobin analyzer. US Patent 6397093.– 2002.
61. Москвин С.В. Основы лазерной терапии/ С.В. Москвин, В.А. Буйлин. //Триада. – Москва. – 2006. – стр. 46-48.
62. Букатый В.И., Павлова Я.В., Сакович С.И., Устинова Г.Г. Биомед. технологии и радиоэлектроника, № 1. – 2005. – ст. 46-57.
63. Raemer D.B. The theoretical effect of carboxyhemoglobin on the pulse oximeter / D.B. Raemer, W.R. Elliot, G.P. Topulos, J.H. Philip // J.Clin.Monit.– V.5(4).– 1989.– p.246-249.
64. Рябов Г.А. Гипоксия критических состояний/ Г.А. Рябов//Медицинаю 1988. – стр. 49-52.
65. Tashiro C. Effects of carboxyhemoglobin on pulse oximetry in humans/ С. Tashiro, Y.H. Koo, K. Fukumitsu, K.Tomi, T. Mashimi, I. Yoshiya // J. of Anesthesia.– V.2 – 1988.– p.36-40.